

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**PATRÍCIA JACQUELINE THYSSEN**

**“CARACTERIZAÇÃO DAS FORMAS IMATURAS E DETERMINAÇÃO DAS  
EXIGÊNCIAS TÉRMICAS DE DUAS ESPÉCIES DE CALIFORÍDEOS (DIPTERA) DE  
IMPORTÂNCIA FORENSE”**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia  
da Universidade Estadual de Campinas, SP,  
para a obtenção do título de Doutor em  
Parasitologia.

Orientador: **Prof. Dr. Arício Xavier Linhares**

Campinas – SP

2005

## FICHA CATALOGRÁFICA

CAMPINAS, 18 DE JANEIRO DE 2005.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. **Arício Xavier Linhares** (Orientador) \_\_\_\_\_

Assinatura

Prof. Dr. **Ângelo Pires do Prado** \_\_\_\_\_

Assinatura

Prof. Dr. **Cláudio José Von Zuben** \_\_\_\_\_

Assinatura

Prof. Dr. **Odair Benedito Ribeiro** \_\_\_\_\_

Assinatura

Prof. Dr. **Wesley Augusto Conde Godoy** \_\_\_\_\_

Assinatura

Prof. Dr. **Sérgio Furtado dos Reis** \_\_\_\_\_

Assinatura

Profª. Dra. **Silmara Marques Allegretti** \_\_\_\_\_

Assinatura

... o amor, a morte e as moscas. Desde que o homem existe, esse sentimento, esse temor, essas presenças nos acompanham sempre. (...) onde alguém põe o olho encontra a mosca. (...) As moscas são (...) as vingadoras de não sabemos o quê; mas sabes que alguma vez te perseguiram e que te perseguirão sempre. Elas vigiam. São as enviadas de alguém inominável, boníssimo e maligno. Seguem-te. Observam-te. Quando finalmente morrer é provável e triste, que baste uma mosca para levar, quem pode dizer para onde, tua pobre alma distraída. As moscas transportam, herdando infinitamente a carga, as almas de nossos mortos, de nossos antepassados, que assim continuam próximos de nós, acompanhando-nos, empenhados em nos proteger. Nossas pequenas almas transmigram através delas e elas acumulam sabedoria e conhecem tudo o que nós não nos atrevemos a conhecer. Quem sabe o último transmissor de nossa torpe cultura ocidental seja o corpo desta mosca, que vem reproduzindo-se sem enriquecer-se ao longo dos séculos. E, bem observada, (...) a mosca não é tão feia como à vista parece. Mas à primeira vista não parece feia, precisamente porque ninguém viu uma mosca à primeira vista. Toda mosca foi vista sempre. Entre a galinha e o ovo há a dúvida de quem veio primeiro. A ninguém ocorreu se a mosca veio antes ou depois. No princípio foi a mosca. (...) A mosca que pousou no seu nariz é descendente direta da que pousou no de Cleópatra. (...) Tu, olhes a mosca.

*As Moscas*

(Augusto Monterroso)

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Arício Xavier Linhares, pela orientação, paciência e oportunidade de aprendizado científico e profissional.

Aos meus pais, à minha irmã Alessandra, ao meu cunhado Antônio, ao meu marido Fábio e à D'Ana, pela grande torcida, carinho, amor e incentivo nos estudos e pela compreensão da ausência e correria constantes, sem os quais este estudo não teria se tornado possível.

Aos Prof(s). Dr(s). Ângelo Pires do Prado, Marlene Tiduko Ueta, Odair Benedito Ribeiro, Silmara Marques Allegretti, Urara Kawazoe e Wesley A. C. Godoy, pelas sugestões e contribuições nos exames de qualificação e prévio.

À Prof. Dra. Ana M. L. Azeredo-Espin, Ana Claudia Lessinger e demais colegas do Laboratório de Genética Animal (CBMEG), pela oportunidade de estudos conjuntos em outras áreas, pelas contribuições no aprendizado e amizade.

Aos Prof(s). Dr(s). Ângelo Pires do Prado, Marlene Tiduko Ueta, Nelson da Silva Cordeiro, Odair Benedito Ribeiro e Silmara Marques Allegretti, pelo grande incentivo, carinho e sempre amizade.

Aos amigos do curso de pós-Parasito, incluindo o pessoal da Zôo, pela amizade e carinho.

Às amigas “moscólogas”, *Lucila eximia* (Lucila M. L. Carvalho) e *Mesembrinella tavares* (Maria Cristina H. Tavares), pela grande amizade, carinho e “tricôs”.

À turma do L<sub>2B</sub>, Dora, Thiago, Rodriguinho, Alcione, Mingui, Erica, Nívea, pela grande amizade, carinho e pelos muitos e muitos momentos agradáveis juntos, “exceto por algumas brincadeiras envolvendo prestação de contas, relatórios técnicos, fotos, cercárias ...”.

À turma do Almoço, para que tenha continuidade.

Ao amigo Rubens, pela amizade, carinho e pela “bóia” nos momentos de quase naufrágio.

Aos técnicos e amigos, Ivo e João, pelo auxílio e socorro nas pesquisas de campo e laboratório, pela invenção de armadilhas mirabolantes, pelas carcaças, pelos gambás ...

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa e apoio financeiro concedidos (Processo nº 00/03009-0).

## ÍNDICE GERAL

<b>1</b>	<b>-</b>	<b>Introdução Geral .....</b>	<b>01</b>
<b>2</b>	<b>-</b>	<b>Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>04</b>
<b>3</b>	<b>-</b>	<b>Objetivos Gerais .....</b>	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>-</b>	<b>Distinção entre as formas imaturas de duas espécies de importância forense: <i>Hemilucilia segmentaria</i> e <i>Hemilucilia semidiaphana</i> (Diptera: Calliphoridae) .....</b>	<b>16</b>
4.1-		Introdução .....	16
4.2 -		Material e Métodos .....	18
4.3 -		Resultados .....	22
4.4 -		Discussão .....	43
<b>5</b>	<b>-</b>	<b>Identificação de duas moscas necrófagas de importância forense — <i>Hemilucilia segmentaria</i> e <i>Hemilucilia semidiaphana</i> (Diptera: Calliphoridae) — usando marcadores moleculares do tipo PCR-RFLP ....</b>	<b>46</b>
5.1-		Introdução .....	46
5.2 -		Material e Métodos .....	49
5.3 -		Resultados .....	52
5.4 -		Discussão .....	55
<b>6</b>	<b>-</b>	<b>O efeito da temperatura no tempo de desenvolvimento e determinação das exigências térmicas dos estágios imaturos de <i>Hemilucilia segmentaria</i> e <i>Hemilucilia semidiaphana</i> (Diptera: Calliphoridae) .....</b>	<b>58</b>
6.1-		Introdução .....	58
6.2 -		Material e Métodos .....	60
6.3 -		Resultados .....	62
6.4 -		Discussão .....	80
<b>7</b>	<b>-</b>	<b>Conclusões Gerais .....</b>	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>-</b>	<b>Bibliografia Geral .....</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>-</b>	<b>Anexos .....</b>	<b>93</b>

## LISTA DE TABELAS

1	- Caracterização de sítios de restrição para <i>Hemilucilia segmentaria</i> e <i>Hemilucilia semidiaphana</i> .....	55
2	- Duração média, em horas, do tempo de vida total (ovo-adulto) e de cada estágio imaturo de <i>Hemilucilia segmentaria</i> submetida a diferentes temperaturas .....	63
3	- Duração média, em horas, do tempo de vida total (ovo-adulto) e de cada estágio imaturo de <i>Hemilucilia semidiaphana</i> submetida a diferentes temperaturas .....	64
4	- Temperatura basal (tb), constante térmica (K) e equações da velocidade de desenvolvimento para cada estágio imaturo e tempo total de desenvolvimento de <i>Hemilucilia segmentaria</i> expostos às temperaturas de 15-35°C .....	69
5	- Temperatura basal (tb), constante térmica (K) e equações da velocidade de desenvolvimento para cada estágio imaturo e tempo total de desenvolvimento de <i>Hemilucilia semidiaphana</i> exposto às temperaturas de 15-35°C .....	70
6	- Médias de peso (mg) obtidas para os estádios larvais de <i>Hemilucilia segmentaria</i> criados em diferentes temperaturas .....	93
7	- Médias de comprimento (cm) obtidas para os estádios larvais de <i>Hemilucilia segmentaria</i> criados em diferentes temperaturas .....	94
8	- Médias de peso (mg) obtidas para os estádios larvais de <i>Hemilucilia semidiaphana</i> criados em diferentes temperaturas .....	95
9	- Médias de comprimento (cm) obtidas para os estádios larvais de <i>Hemilucilia semidiaphana</i> criados em diferentes temperaturas .....	96
10	- Ajuste de curvas com relação a variável peso para os estádios larvais de <i>Hemilucilia segmentaria</i> criada a 15°C .....	97
11	- Ajuste de curvas com relação a variável peso para os estádios larvais de <i>Hemilucilia segmentaria</i> criada a 20°C .....	97
12	- Ajuste de curvas com relação a variável peso para os estádios larvais de <i>Hemilucilia segmentaria</i> criada a 25°C .....	97
13	- Ajuste de curvas com relação a variável peso para os estádios larvais de <i>Hemilucilia segmentaria</i> criada a 30°C .....	97
14	- Ajuste de curvas com relação a variável peso para os estádios larvais de <i>Hemilucilia segmentaria</i> criada a 35°C .....	98
15	- Ajuste de curvas com relação a variável comprimento para os estádios larvais de <i>Hemilucilia segmentaria</i> criada a 15°C .....	98

16	- Ajuste de curvas com relação a variável comprimento para os estádios larvais de <i>Hemilucilia segmentaria</i> criada a 20°C .....	98
17	- Ajuste de curvas com relação a variável comprimento para os estádios larvais de <i>Hemilucilia segmentaria</i> criada a 25°C .....	98
18	- Ajuste de curvas com relação a variável comprimento para os estádios larvais de <i>Hemilucilia segmentaria</i> criada a 30°C .....	99
19	- Ajuste de curvas com relação a variável comprimento para os estádios larvais de <i>Hemilucilia segmentaria</i> criada a 35°C .....	99
20	- Ajuste de curvas com relação a variável peso para os estádios larvais de <i>Hemilucilia semidiaphana</i> criada a 15°C .....	99
21	- Ajuste de curvas com relação a variável peso para os estádios larvais de <i>Hemilucilia semidiaphana</i> criada a 20°C .....	99
22	- Ajuste de curvas com relação a variável peso para os estádios larvais de <i>Hemilucilia semidiaphana</i> criada a 25°C .....	100
23	- Ajuste de curvas com relação a variável peso para os estádios larvais de <i>Hemilucilia semidiaphana</i> criada a 30°C .....	100
24	- Ajuste de curvas com relação a variável peso para os estádios larvais de <i>Hemilucilia semidiaphana</i> criada a 35°C .....	100
25	- Ajuste de curvas com relação a variável comprimento para os estádios larvais de <i>Hemilucilia semidiaphana</i> criada a 15°C .....	100
26	- Ajuste de curvas com relação a variável comprimento para os estádios larvais de <i>Hemilucilia semidiaphana</i> criada a 20°C .....	101
27	- Ajuste de curvas com relação a variável comprimento para os estádios larvais de <i>Hemilucilia semidiaphana</i> criada a 25°C .....	101
28	- Ajuste de curvas com relação a variável comprimento para os estádios larvais de <i>Hemilucilia semidiaphana</i> criada a 30°C .....	101
29	- Ajuste de curvas com relação a variável comprimento para os estádios larvais de <i>Hemilucilia semidiaphana</i> criada a 35°C .....	101
30	- Ajuste de curvas para a relação tempo de desenvolvimento total vs temperatura para a espécie <i>Hemilucilia segmentaria</i> .....	102
31	- Ajuste de curvas para a relação tempo de desenvolvimento total vs temperatura para a espécie <i>Hemilucilia semidiaphana</i> .....	102



## LISTA DE FIGURAS

1	-	Gaiola plástica transparente para criação e manutenção de indivíduos adultos de dípteros .	19
2	-	Frascos plásticos utilizados para criação de imaturos de dípteros .....	20
3	-	Câmara climática de germinação modelo Fanen 387 utilizada para o desenvolvimento de imaturos de dípteros .....	20
4	-	Fases do ciclo de vida de <i>Hemilucilia segmentaria</i> .....	23
5	-	Desenho esquemático do ovo mostrando a linha de eclosão .....	29
6	-	Desenho esquemático da larva de 1º estágio mostrando em (A) vista dorsal, em (B) vista ventral, em (C) vista lateral, em (D) o esqueleto céfalo-faríngeo, em (E) os espiráculos posteriores e em (F) a região posterior .....	29
7	-	Desenho esquemático da larva de 2º estágio mostrando em (A) vista dorsal, em (B) vista ventral, em (C) vista lateral, em (D) o esqueleto céfalo-faríngeo, em (E) os espiráculos posteriores, em (F) o espiráculo anterior e em (G) a região posterior .....	30
8	-	Desenho esquemático da larva de 3º estágio mostrando em (A) vista dorsal, em (B) vista ventral, em (C) vista lateral, em (D) vista lateral do esqueleto céfalo-faríngeo, em (E) vista dorsal do esqueleto céfalo-faríngeo, em (F) o espiráculo posterior, em (G) o espiráculo anterior e em (H) a região posterior .....	30
9	-	Desenho esquemático do pupário mostrando em (A) vista dorsal, em (B) vista ventral, em (C) vista lateral, em (D) região anterior e em (E) a região posterior .....	31
10	-	Ovos .....	32
11	-	Ovo mostrando em detalhe a micrópila (MC) e a linha de eclosão (LE) por MEV .....	32
12	-	Região anterior da larva de 1º estágio mostrando em detalhe o esqueleto céfalo-faríngeo (ECF) e as primeiras bandas de espinhos (BE) .....	32
13	-	Região posterior da larva de 1º estágio mostrando em detalhe o espiráculo posterior (ESP) .....	32
14	-	Região anterior da larva de 2º estágio mostrando em detalhe o esqueleto céfalo-faríngeo (ECF) e o espiráculo anterior (ESA) .....	32
15	-	Detalhe do espiráculo anterior com as projeções digitiformes (PDG) .....	32
16	-	Região posterior da larva de 2º estágio mostrando em detalhe os espiráculos posteriores (ESP) .....	32
17	-	Espiráculo posterior da larva de 2º estágio mostrando em detalhe o peritrema (PM) e as fendas estigmáticas (FEST) .....	32

<b>18</b>	- Região anterior da larva de 3° estágio mostrando em detalhe o esqueleto céfalo-faríngeo (ECF) e o espiráculo anterior (ESA) .....	33
<b>19</b>	- Esqueleto céfalo-faríngeo da larva de 3° estágio: vista lateral e dorsal .....	33
<b>20</b>	- Região anterior da larva de 3° estágio mostrando em detalhe os lobos cefálicos (LCF) por MEV .....	33
<b>21</b>	- Região anterior da larva de 3° estágio mostrando em detalhe o canal alimentar (CAL) por MEV .....	33
<b>22</b>	- Espiráculo anterior da larva de 3° estágio por MEV .....	33
<b>23</b>	- Espiráculo anterior da larva de 3° estágio mostrando em detalhe as projeções digitiformes (PDG) por MEV .....	33
<b>24</b>	- Detalhe da primeira banda de espinhos em larva de 3° estágio: espinhos simples (ESP) e espinhos múltiplos (EMP) por MEV .....	33
<b>25</b>	- Detalhe da segunda banda de espinhos em larva de 3° estágio por MEV .....	33
<b>26</b>	- Região posterior da larva de 3° estágio mostrando em detalhe os espiráculos posteriores (ESP), a distribuição dos tubérculos (TBC) e a placa anal (PLA) .....	34
<b>27</b>	- Espiráculo posterior da larva de 3° estágio mostrando em detalhe o peritrema (PM) e as fendas estigmáticas (FEST) .....	34
<b>28</b>	- Espiráculo posterior da larva de 3° estágio mostrando em detalhe as projeções filamentosas (PJF) por MEV .....	34
<b>29</b>	- Pupário .....	34
<b>30</b>	- Pupário mostrando em detalhe as dobras do tegumento (DTG) e os espiráculos anteriores (ESA) por MEV .....	34
<b>31</b>	- Pupário mostrando em detalhe os cornos respiratórios (CR) por MEV.....	34
<b>32</b>	- Pupário mostrando em detalhe os espiráculos posteriores (ESP) por MEV .....	34
<b>33</b>	- Desenho esquemático da larva de 1° estágio mostrando em (A) vista dorsal, em (B) vista ventral, em (C) vista lateral, em (D) o esqueleto céfalo-faríngeo, em (E) os espiráculos posteriores e em (F) a região posterior .....	40
<b>34</b>	- Desenho esquemático da larva de 2° estágio mostrando em (A) vista dorsal, em (B) vista ventral, em (C) vista lateral, em (D) o esqueleto céfalo-faríngeo, em (E) os espiráculos posteriores, em (F) o espiráculo anterior e em (G) a região posterior .....	40
<b>35</b>	- Desenho esquemático da larva de 3° estágio mostrando em (A) vista dorsal, em (B) vista ventral, em (C) vista lateral, em (D) vista lateral do esqueleto céfalo-faríngeo, em (E) vista dorsal do esqueleto céfalo-faríngeo, em (F) o espiráculo posterior, em (G) o espiráculo anterior e em (H) a região posterior .....	41

36	- Desenho esquemático do pupário mostrando em (A) vista dorsal, em (B) vista ventral, em (C) vista lateral, em (D) região anterior e em (E) a região posterior .....	41
37	- Ovo mostrando em detalhe a micrópila (MC) e a linha de eclosão (LE) por MEV .....	42
38	- Região anterior da larva de 1º estágio mostrando em detalhe o esqueleto céfalo-faríngeo (ECF) e as primeiras bandas de espinhos (BE) .....	42
39	- Região posterior da larva de 1º estágio mostrando em detalhe o espiráculo posterior (ESP) .....	42
40	- Região anterior da larva de 2º estágio mostrando em detalhe o esqueleto céfalo-faríngeo (ECF) e o espiráculo anterior (ESA) .....	42
41	- Região posterior da larva de 2º estágio mostrando em detalhe os espiráculos posteriores (ESP) .....	42
42	- Região anterior da larva de 3º estágio mostrando em detalhe os lobos cefálicos (LCF) por MEV .....	42
43	- Região anterior da larva de 3º estágio mostrando em detalhe o esqueleto céfalo-faríngeo (ECF) e o espiráculo anterior (ESA) .....	42
44	- Esqueleto céfalo-faríngeo da larva de 3º estágio: vista lateral e dorsal .....	42
45	- Região posterior da larva de 3º estágio mostrando em detalhe os espiráculos posteriores (ESP), a distribuição dos tubérculos (TBC) e a placa anal (PLA) .....	43
46	- Espiráculo posterior da larva de 3º estágio mostrando em detalhe o peritrema (PM), as fendas estigmáticas (FEST) e o botão (BT) .....	43
47	- Espiráculo posterior da larva de 3º estágio mostrando em detalhe as projeções filamentosas (PJF) por MEV.....	43
48	- Pupário .....	43
49	- Produtos amplificados da região COI e região controle para <i>Hemilucilia segmentaria</i> (Hsg) e <i>Hemilucilia semidiaphana</i> (Hsd) .....	53
50	- Padrões diagnósticos de PCR-RFLP de amplificações de COI e da região controle (RC) para <i>Hemilucilia segmentaria</i> (Hsg) e <i>Hemilucilia semidiaphana</i> (Hsd) .....	54
51	- Variação média de ganho e perda de massa (mg) para os estádios larvais de <i>Hemilucilia segmentaria</i> expostos às diferentes condições de temperatura .....	65
52	- Variação média de ganho e perda de massa (mg) para os estádios larvais de <i>Hemilucilia semidiaphana</i> expostos às diferentes condições de temperatura .....	66

<b>53</b>	- Variação média do comprimento (cm) dos estádios larvais de <i>Hemilucilia segmentaria</i> expostos às diferentes condições de temperatura .....	67
<b>54</b>	- Variação média do comprimento (cm) dos estádios larvais de <i>Hemilucilia semidiapha</i> expostos às diferentes condições de temperatura .....	68
<b>55</b>	- Velocidade e tempo de desenvolvimento, em função da temperatura, para cada estágio imaturo e tempo total de desenvolvimento de <i>Hemilucilia segmentaria</i> exposta às temperaturas de 15-35°C .....	71
<b>56</b>	- Velocidade e tempo de desenvolvimento, em função da temperatura, para cada estágio imaturo e tempo total de desenvolvimento de <i>Hemilucilia semidiaphana</i> exposta às temperaturas de 15-35°C .....	72
<b>57</b>	- Modelo não-linear de desenvolvimento para as espécies <i>Hemilucilia segmentaria</i> e <i>Hemilucilia semidiaphana</i> criadas em diferentes temperaturas .....	74
<b>58</b>	- Modelo não-linear de desenvolvimento para a espécie <i>Hemilucilia segmentaria</i> , criada em diferentes temperaturas, com relação a variável peso .....	75
<b>59</b>	- Modelo não-linear de desenvolvimento para a espécie <i>Hemilucilia segmentaria</i> , criada em diferentes temperaturas, com relação a variável comprimento .....	76
<b>60</b>	- Modelo não-linear de desenvolvimento para a espécie <i>Hemilucilia semidiaphana</i> , criada em diferentes temperaturas, com relação a variável peso .....	78
<b>61</b>	- Modelo não-linear de desenvolvimento para a espécie <i>Hemilucilia semidiaphana</i> , criada em diferentes temperaturas, com relação a variável comprimento .....	79

## RESUMO

A correta identificação e avaliação da idade de insetos envolvidos com a decomposição de cadáveres é de suma importância para a estimativa do intervalo pós-morte (IPM) na área das ciências forenses, particularmente quando o IPM é baseado em informações sobre o ciclo de vida de insetos necrófagos. Entretanto, a análise destes parâmetros em insetos, especialmente quando se encontram em seus estágios imaturos, é difícil mesmo para taxonomistas bem treinados. Além das minúsculas diferenças morfológicas que há entre várias espécies, algumas variáveis tais como temperatura e substâncias tóxicas podem afetar o seu tempo de desenvolvimento gerando um erro no cálculo do IPM. Entre os insetos envolvidos neste processo, as larvas de dípteros da família Calliphoridae são freqüentemente as mais predominantes consumidoras de carcaça e estão presentes em todos os estágios de decomposição. Assim, este estudo teve como objetivo caracterizar morfológicamente e avaliar o tempo de desenvolvimento e as exigências térmicas das formas imaturas de duas espécies de dípteros em diferentes temperaturas: *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) e *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani) (Calliphoridae). Todos os experimentos foram realizados em câmaras climáticas com temperaturas controladas em 10, 15, 20, 25, 30 e 35°C, com fotoperíodo de 12 horas e umidade relativa de 70%. Dieta artificial própria para larvas foi oferecida para que estas completassem seu desenvolvimento. Neste estudo, além da descrição e caracterização morfológica tradicional, também foram utilizadas as técnicas da reação em cadeia da polimerase, associada ao polimorfismo baseado no comprimento do fragmento de restrição (PCR-RFLP), para a identificação das duas espécies.

Palavras-chaves: Calliphoridae; descrição dos estágios imaturos; identificação de espécies; biologia; intervalo pós-morte; Entomologia Forense; Medicina Legal.

## ABSTRACT

The correct identification and age determination of insect species involved in cadaver decomposition is of particular importance in estimating the post-mortem interval (PMI) in forensic sciences, particularly since the PMI is based on information on the life cycle of necrophagous insects. However, the correct identification of several insects species, especially in their immature stages, is difficult even for experienced taxonomists. In addition to the minuscule morphological differences between several species, there are some variables such as temperature and toxic substances that may affect the developmental time of insects, generating errors in the estimate of the PMI. Among the insects that are involved in cadaver decomposition, maggots of blowflies (Calliphoridae) are often the most important consumers of carrion and are present in all stages of decomposition. Thus, this study aimed to characterize morphologically and to evaluate the developmental time and the thermal requirements of the immature stages of two species of blowflies reared in different temperatures: *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) e *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani) (Calliphoridae). All experiments were done in growth chambers with temperatures set at 10, 15, 20, 25, 30 and 35°C, photophase of 12 hours and relative humidity at 70%. The maggots were reared using an artificial diet for their complete development. In addition to traditional morphological description and characterization of the immatures, the usefulness of the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) to identify the two species mentioned above was also assessed in this study.

Key words: Calliphoridae; description of immature stages; species identification; biology; pos-mortem interval; Forensic Entomology; Legal Medicine.

## 1 — INTRODUÇÃO GERAL

De modo geral, os insetos sempre têm atraído a atenção de entomologistas quer por sua importância como vetores de patógenos para humanos, quer pelos danos econômicos que podem vir a causar como larvas de certas espécies que provocam miíases primárias ou secundárias (Zumpt, 1965).

O estudo dos insetos também tem contribuído em investigações legais, sendo apenas na última década definido como um campo distinto dentro das ciências forenses. Assim, a entomologia na área forense, conhecida como Entomologia Forense, pode ser definida como a aplicação do estudo de insetos e outros artrópodes que, em associação com procedimentos criminalísticos, tem o propósito de descobrir informações úteis para uma investigação (Nuorteva, 1977; Keh, 1985; Smith, 1986; Catts & Goff, 1992).

Para a estimativa do tempo de morte de um corpo, através de dados entomológicos, uma série de estudos têm sido conduzidos levando em conta vários fatores, como a presença e frequência de insetos no corpo associados a um estágio de decomposição específico (Méglin, 1894), detecção de substâncias tóxicas (Goff & Lord, 1994) e demais circunstâncias que podem influenciar no desenvolvimento dos imaturos que se criam nesse substrato como temperatura, umidade relativa, latitude, altitude e outros (Greenberg & Kunich, 2002).

Essencialmente, a análise faunística compreende a sistemática dos espécimes envolvidos, sua correta identificação e, principalmente, a interpretação coerente das informações oferecidas pela presença ou ausência dos mesmos no cadáver, exigindo uma meticulosa análise de todos os parâmetros envolvidos (Luz, 1998).

Outros métodos como os histológicos, químicos, bacteriológicos e/ou fenômenos cadavéricos também são utilizados por médicos legistas para o estabelecimento do intervalo pós-morte. No entanto, decorridas 72 horas da morte, a Entomologia Forense é usualmente o instrumento de maior acurácia utilizado para a estimativa deste intervalo (Kashyap & Pillai, 1989).

Apesar da eficácia, a elevada diversidade de grupos encontrados explorando o mesmo recurso e, por vezes, as minúsculas diferenças morfológicas que há entre os mesmos, faz com que os insetos presentes no material em decomposição nem sempre sejam tão facilmente identificados, especialmente na fase imatura, prejudicando a obtenção e observação de dados biológicos que podem ser úteis para estimar o tempo ou intervalo pós-morte (IPM).

Neste sentido, há poucos estudos enfocando os aspectos morfológicos e biológicos para a identificação de espécies nas fases imaturas tais como os feito por Greenberg & Szyska (1984), Erzinçlioglú (1989), Liu & Greenberg (1989), Greenberg (1990), Amorim & Ribeiro (2001) e, também, poucos contribuindo para a estimativa da idade cronológica como os de Ellison & Hampton (1982), Nishida (1984), Monteiro-Filho (1989), Tantawi & Greenberg (1993), Davies & Ratcliffe (1994), Wells & Lamotte (1995), Souza (1998), Grassberger & Reiter (2001; 2002a; 2002b).

Assim, tendo em vista a pouca especificidade de estudos anteriores sobre os aspectos morfológicos, biológicos e cronológicos, principalmente das formas imaturas de espécies neotropicais de importância forense, propôs-se desenvolver esta pesquisa visando a identificação — por meio de estudos morfológicos tradicionais e métodos moleculares — e a utilização de alguns dos aspectos biológicos de insetos para avaliar a idade cronológica, a fim de se obter dados necessários para estimar o IPM. Os resultados obtidos e as



conclusões deste estudo encontram-se nos capítulos que seguem após a Revisão Bibliográfica e os Objetivos.

O estudo da fauna de cadáver constitui a aplicação forense mais importante da entomologia na Medicina Legal. O armazenamento de todo esse conhecimento, juntamente com a análise dos dados de estudos de decomposição e histórias de vida de insetos, que podem então ser chamados de “indicadores forenses”, serve para incrementar a exatidão das estimativas do IPM, contribuindo também para a agilização do tempo requerido para análise nas perícias médico-legais (Goff *et al.*, 1988).

## 2 — REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### Entomologia Forense – Conceito e Breve Histórico

A Entomologia Forense é um amplo campo onde a ciência dos artrópodes e o sistema judicial interage. Pode ser dividida ou subdividida em três grandes áreas (Lord & Stevenson, 1986): *urbana* (abrange os insetos que afetam o homem e seu ambiente), *pragas de produtos armazenados* (de grande importância econômica relacionada com insetos ou parte deles comumente encontrados contaminando alimentos) e *médico-legal* (que tem seu foco nos componentes criminais do sistema legal lidando, principalmente, com insetos necrófagos).

O uso de insetos relacionados a eventos criminais foi citado, pela primeira vez, num livro chinês de Sung Tz'u em 1235 (Benecke, 2001). Numa investigação de assassinato por golpes de foice, ordenaram que todos os moradores da aldeia depositassem suas foices no solo. A do assassino, com resíduos de sangue, foi denunciada pela presença das moscas. Em 1855, Bergeret, um doutor francês, relatou suas conclusões sobre a data de morte de um bebê, baseadas no encontro de insetos no cadáver absolvendo uma família que tinha se mudado recentemente para uma residência (Benecke, 2001). Com base na fase de desenvolvimento das larvas, foi concluído que o bebê era de uma família que vivera na casa vários anos antes e não da que vivera ali recentemente. Entretanto, foi “La Faune des Cadavres” de Mégnin (1894), uma das mais importantes e pioneiras publicações destacando o papel dos insetos no âmbito da estimativa do tempo de morte, que difundiu a Entomologia Forense como ciência.

No Brasil, os primeiros trabalhos com insetos ligados a Medicina Legal começaram com Oscar Freire (1914 e 1923). Atualmente, um grande número de estudos vem sendo

realizados usando animais mortos como isca e focalizando aspectos como os processos de decomposição e sucessão ecológica em diferentes ambientes e altitudes (Monteiro-Filho & Penereiro, 1987; Souza & Linhares, 1997; Carvalho *et al.*, 2000; Carvalho & Linhares, 2001; Tavares, 2003; Ribeiro, 2003; Carvalho *et al.*, 2004), em diferentes tamanhos de carcaça (Thyssen, 2000), sobre biologia, ecologia e identificação de espécies necrófagas (Von Zuben *et al.*, 1996; Moura *et al.*, 1997; Souza, 1998; Amorim & Ribeiro, 2001) e com detecção e efeito de substâncias tóxicas em insetos (Carvalho *et al.*, 2001).

### **Aplicações da Entomologia Forense**

Várias aplicações nessa área da entomologia foram enumeradas por Nuorteva (1977), Keh (1985), Smith (1986), Catts & Haskell (1990), Catts & Goff (1992) e Oliva *et al.* (1995): determinação do tempo (intervalo pós-morte ou IPM), local, modo ou causa da morte; movimento do cadáver; associação dos suspeitos com a cena do crime; investigação de substâncias tóxicas; casos envolvendo possível morte súbita; e acidentes de trânsito com causa desconhecida.

Na literatura há uma série de relatos demonstrando situações nas quais as evidências entomológicas foram usadas para provar falta de cuidados. Por exemplo, o mau trato de idosos em casas de repouso e asilos, além de negligência e maus tratos com relação a crianças (Lord & Rodriguez, 1989; Goff *et al.*, 1991; Benecke & Lessig, 2001).

A mera presença de vespas e abelhas dentro de carros, ou mesmo as picadas destes insetos, podem ser responsáveis por um grande número de acidentes de carros ocupados apenas pelos motoristas, dando margem à resolução de casos envolvendo a morte sem causa conhecida (Catts & Haskell, 1990).

Os insetos podem ainda influenciar na interpretação de rastros de sangue após um crime. Baratas, formigas ou outros insetos podem espalhar marcas de sangue pelo ambiente criando artefatos e confundindo a cena do crime (Brown *et al.*, 2000). Algumas espécies de moscas podem ainda alimentar-se de sangue fresco e regurgitá-lo posteriormente em outros locais, dificultando a interpretação de um caso (Benecke & Barksdale, 2003).

Com o advento das técnicas de pesquisa de DNA em biologia molecular, amostras de sangue coletadas do intestino de insetos presentes na cena do crime têm sido utilizadas para identificar suspeitos de estupro e assassinato (Repogle *et al.*, 1994).

### **A importância dos insetos nas investigações criminais**

Os insetos são os mais numerosos e diversificados organismos existentes no planeta. Enquanto menos de 1 milhão de espécies já foram descritas, pesquisas indicam que pelo menos de 3 a 30 milhões podem existir de fato (Castner, 2000). Eles podem ser encontrados em quase todos os habitats terrestres e em muitos aquáticos, exceto no interior dos oceanos. São capazes de se deslocar rapidamente por distâncias consideráveis quando procuram por alimento ou por um local adequado para colocar seus ovos.

Centenas de espécies de insetos são atraídas pelo “odor da decomposição” dos corpos poucos minutos após a morte, e este comportamento é o que os tornam tão convenientes para o uso em Medicina Legal. Na maioria das vezes, os dípteros são os primeiros a chegar. Dependendo das suas preferências biológicas, começam colonizando as partes moles do corpo como feridas abertas ou os orifícios naturais como ouvidos, boca, nariz e olhos. Depois chegam os insetos predadores, como formigas, vespas e alguns besouros, e os parasitóides, que se alimentam de ovos, larvas ou mesmo pupas dos dípteros que se desenvolvem no cadáver. A cartilagem e os tecidos secos que sobram, depois que a

maior parte dos outros organismos alimentaram-se, são consumidos pelos besouros. Este fenômeno de chegada e substituição sequencial de espécies é conhecido como sucessão ecológica e é também um parâmetro importante para a estimativa do IPM.

### **Estimativa do intervalo pós-morte**

Quando um corpo é encontrado dias, semanas, meses ou anos após a morte, a temperatura do corpo e outras condições como o *livor* ou o *rigor mortis* deixam de ser ou não são mais tão apropriados para estimar o tempo de morte (Amendt *et al.*, 2004). Nestes casos, os insetos podem fornecer importantes indicações do IPM de um corpo por meio de dois métodos. O primeiro, proposto por Mégnin (1894), é baseado na observação dos insetos presentes no corpo em um dado tempo, sabendo-se que certas espécies de insetos são associadas a determinado estágio de decomposição do corpo. O segundo método, mais amplamente utilizado, trata do conhecimento dos ciclos de vida dos insetos, cujas larvas se criam nos corpos (Nuorteva, 1977; Erzinçlioglú, 1983).

Tanto um procedimento quanto outro é prejudicado pela grande influência que o ambiente exerce sobre a população dos insetos, ou seja, a ocorrência ou o desenvolvimento de uma dada espécie depende da temperatura, umidade relativa, latitude e altitude. Outros fatores como a presença de substâncias tóxicas, a densidade larval e a competição também devem ser consideradas por ocasionalmente interferir no tempo de desenvolvimento, tamanho e peso das espécies relacionadas (Ullyett, 1950; Hanski, 1987; Goodbrood & Goff, 1990; Wells & Greenberg, 1992; Reis *et al.*, 1996; Von Zuben *et al.*, 2000).

A não observação de todos os parâmetros envolvidos com a cena do crime pode implicar num erro de estimativa do IPM (Greenberg & Kunich, 2002). Um exemplo prático disso pode ser assinalado em relação ao tempo de desenvolvimento de algumas espécies de

importância forense, que pode ser afetado pela ação de drogas ou de seus metabólitos eventualmente presentes no corpo, gerando conclusões imprecisas (Goff & Lord, 1994).

### **Decomposição e sucessão ecológica**

A decomposição como parte integrante do ciclo da natureza, é efetuada primeiramente pela ação de organismos como fungos e bactérias e em seguida por uma série de artrópodes, entre os quais predominam principalmente os insetos sarcossaprófagos (Nuorteva, 1977; Jirón & Cartín, 1981). Este processo consiste, sobretudo, na degradação metabólica da matéria orgânica em compostos orgânicos e inorgânicos simples, com conseqüente liberação de energia. Contudo, o processo de degradação biológica é contínuo podendo ser dividido ou subdividido em estágios com o propósito de facilitar seu estudo, sendo o número de estágios e o tempo de duração de cada um fortemente dependente das condições climáticas e sazonais (Bornemissza, 1957).

Assim, vários autores em diferentes localidades e circunstâncias fizeram o reconhecimento desses estágios em seus trabalhos, cada qual propondo uma divisão que melhor se adequasse às condições apresentadas. Mégnin (1894) dividiu a decomposição cadavérica em oito estágios; Payne (1965) seis; Bornemissza (1957) cinco; Reed (1958) juntamente com Jirón & Cartin (1981) reconheceram quatro.

Em trabalhos realizados com carcaças em decomposição na região de Campinas (Souza & Linhares, 1997; Carvalho *et al.*, 2000; Thyssen, 2000; Carvalho & Linhares, 2001), Jundiaí (Tavares, 2003) e Mogi Guaçu (Ribeiro, 2003), SP, os estágios que mais se enquadraram às condições climáticas foram os propostos por Bornemissza (1957) que são classificados como: estágio de *decomposição inicial* (ou carcaça recente), *putrefação* (ou

inchaço), *putrefação escura* (ou decomposição ativa), *fermentação* (ou decomposição avançada) e *seco* (ou final com restos de esqueleto).

Durante o processo de decomposição o substrato muda continuamente tanto física como quimicamente, de tal maneira que sua adequação para colonização por diversos organismos também muda. Em consequência disso ocorre um processo de sucessão ecológica que pode ser definido como o acréscimo ou substituição seqüencial de espécies em uma comunidade, acompanhada de alterações na abundância relativa das espécies presentes, de interações de competição e coexistência populacional, resultando na modificação abrupta ou gradual da comunidade (Lincoln *et al.*, 1988). Acredita-se que este processo seja controlado pela comunidade decompositora, muito embora o ambiente físico determine o padrão e a velocidade da mudança, muitas vezes também limitando a extensão deste desenvolvimento.

### **Fauna decompositora**

Entre os organismos envolvidos na decomposição estão bactérias, fungos, invertebrados e vertebrados, de pequeno ou grande porte, tais como roedores, carnívoros, marsupiais e algumas aves. Nesta fauna encontra-se uma grande diversidade de grupos, conhecidos como decomponentes, redutores ou saprófitos, porém apenas os artrópodes e mais especificamente os insetos são os que têm maior importância do ponto de vista forense.

Estes organismos podem utilizar o substrato de três formas distintas: decompor o substrato diretamente usando a energia obtida para seu crescimento; atacar outros organismos ou utilizar seus excrementos; ou utilizar o substrato simplesmente como um sítio de fixação enquanto obtêm suas necessidades nutricionais do meio que os cerca.

Alguns usam, ainda, o calor da decomposição para incubar seus ovos. Assim, dentro da comunidade de invertebrados podem ser reconhecidas quatro categorias: espécies necrófagas, predadores e parasitóides das espécies necrófagas, espécies onívoras e eventuais ou acidentais (Nuorteva, 1977; Smith, 1986; Catts & Goff, 1992).

De um modo geral, o conceito de fauna decompositora inclui todo animal que participa do processo de destruição do corpo em qualquer fase do período transformativo do cadáver a partir da decomposição da matéria orgânica, criando condições propícias para seu desenvolvimento e proliferação. Quanto a sazonalidade, populações de insetos apresentam um pico de maior atividade no verão, sendo menor durante a primavera e o outono e ainda menor no inverno (Hanski, 1987).

Os himenópteros, em primeira instância, não apresentam grande valor na estimativa do IPM. Seus representantes mais encontrados nos restos de decomposição são vespas e formigas que predam larvas e adultos de dípteros ou, no caso de parasitóides, atacando larvas e pupas de dípteros. De modo geral, os insetos sociais não são utilizados em investigações forenses. Um caso interessante foi estudado por Goff & Win (1997), no qual um corpo encontrado em avançado estágio de putrefação possuía uma colônia de formigas bem estabelecida, sendo possível estimar o IPM através do intervalo mínimo requerido para o estabelecimento da colônia de acordo com o número de castas presentes.

### **Família Calliphoridae**

A família Calliphoridae é representada no Novo Mundo por 20 espécies endêmicas e 4 introduzidas, incluídas em 7 gêneros: *Chloroprocta*, *Cochliomyia*, *Comptosyops*, *Chrysomya*, *Hemilucilia*, *Lucilia* e *Paralucilia*. Possui uma grande diversidade de ciclos de vida dentre os vários gêneros que a compõem, porém, algumas



espécies, fazem parte de forma expressiva da fauna decompositora de carcaça animal (Norris, 1965).

A fácil adaptação e vasta distribuição geográfica de algumas espécies do gênero *Chrysomya* introduzidas no Brasil (Guimarães *et al.*, 1978; Guimarães *et al.*, 1979; Prado & Guimarães, 1982), tem resultado no deslocamento de espécies nativas que compartilham de nichos ecológicos semelhantes. Assim, cresce a importância de realizarem-se mais estudos relativos à biologia de outras espécies de califorídeos, até mesmo com o objetivo de avaliar o impacto desta introdução.

Recentemente, em levantamentos da dipterofauna decompositora de carcaças de animais e cadáveres humanos realizados na região de Campinas - SP por Carvalho (1996), Souza & Linhares (1997), Carvalho *et al.* (2000), Thyssen (2000) e Carvalho *et al.* (2004), as espécies de Calliphoridae destacaram-se por terem um importante papel na decomposição tanto com relação à abundância quanto à frequência e por utilizarem esses substratos para a criação de suas larvas sendo, portanto, de potencial importância médico-legal.

Em ambiente urbano, puderam ser classificadas como indicadoras forenses, por serem úteis no cálculo da estimativa do IPM neste ambiente, as espécies *Chrysomya albiceps*, *C. megacephala*, *C. putoria* e *Lucilia eximia*. Outras espécies como *Chloroprocta idioidea*, *Cochliomyia macellaria*, *Hemilucilia segmentaria*, *H. semidiaphana* e *Paralucilia fulvinota* foram posteriormente incluídas como indicadoras forenses, em estudos envolvendo a fauna associada com suínos em ambiente de mata natural (Carvalho *et al.*, 2004).

## **Tempo de desenvolvimento de insetos vs temperatura vs IPM**

A idade de um inseto encontrado num corpo, especialmente dos estágios imaturos, pode fornecer evidências para a estimativa do IPM, dependendo da espécie de inseto envolvida, das condições inerentes ao substrato onde se encontram e sobretudo das condições climáticas registradas na cena da morte. Isto porque muitos processos fisiológicos em insetos são altamente dependentes da temperatura tais como as taxas de desenvolvimento ovariano, de fertilidade, de sobrevivência e de mortalidade (Wall *et al.*, 1992), por conseguinte influenciando no seu tempo de desenvolvimento. De formas diferentes em cada etapa, o estágio larval é o mais afetado (Amoundi *et al.*, 1994).

De modo geral, as necessidades térmicas dos insetos podem ser avaliadas por meio de uma constante térmica ( $K$ ). Esta constante inicialmente proposta por Réaumur em 1735 (Silveira Neto *et al.*, 1976), hipotetiza que a relação entre a taxa de desenvolvimento e temperatura é linear no meio-alcance de uma curva, com um limite letal superior e um limiar mais baixo, chamado de temperatura base, abaixo do qual o desenvolvimento cessa, já que os insetos passam a crescer ou acumular energia apenas a partir de sua temperatura base (Haddad *et al.*, 1999).

Assim, baseado na taxa de desenvolvimento dependente da temperatura na qual ele ocorreu surge o modelo de graus-dias, graus-horas ou horas-acumuladas (ADH)<sup>\*</sup>, que tem sido usado há muito tempo para prever o tempo de aplicações de inseticidas no controle de pragas agrícolas. O ADH também tem sido utilizado na área forense para estimar a idade de larvas. Contudo, algumas observações devem ser levadas em conta, como a obtenção precisa (ou a mais próxima) da temperatura de desenvolvimento, o tipo de ambiente onde foram

---

<sup>\*</sup> Em inglês, *accumulated degree hours* (ADH).

coletados os espécimes imaturos, o conhecimento do ciclo de vida do inseto e de sua temperatura base, o comportamento do inseto mediante variação de temperatura, a submersão temporária de qualquer um dos estádios, a presença de uma massa larval e até mesmo de substâncias tóxicas (Greenberg & Kunich, 2002).

### **Outras pesquisas em Entomologia Forense**

Tanto espécimes imaturos, incluindo os pupários, quanto adultos de dípteros — um dos grupos mais representativos na decomposição animal — que se criam no cadáver, têm sido muito utilizados como alternativa para detecção de substâncias tóxicas, principalmente quando os métodos convencionais não a permitem (Beyer *et al.*, 1980; Kintz *et al.*, 1990; Goff & Lord, 1994; Hédouin *et al.*, 1999). Tal importância reside no fato de que estes organismos não metabolizam as drogas ou eventuais contaminantes presentes no corpo e assim os mantêm em seus tecidos, podendo ser identificados posteriormente, por meio de análises toxicológicas, dias e até anos após a morte (Goff *et al.*, 1989). Tanto a análise de insetos para detectar substâncias tóxicas como a investigação dos efeitos destas substâncias em seu desenvolvimento é conhecida como Entomotoxicologia (Goff & Lord, 1994).

O desenvolvimento de marcadores moleculares a partir de adaptações da técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase) foi um dos grandes avanços na área de biologia molecular. Trata-se de uma técnica relativamente simples, que pode ser utilizada na identificação em nível de espécie, de indivíduos ou populações de insetos de importância forense e relevante quando a diferenciação não é possível ou duvidosa usando-se os critérios morfológicos. Os dípteros têm sido os mais estudados tanto para a obtenção de marcadores como no sequenciamento do DNA (Sperling *et al.*, 1994; Malgorn & Coquoz,

1999; Wells & Sperling, 2001; Wells *et al.*, 2001; Stevens & Wall, 2001; Wallman & Donellan, 2001; Harvey *et al.*, 2003).

Outro método que eventualmente pode ser utilizado para caracterizar e distinguir diferentes populações de espécies de importância forense é a análise do perfil de hidrocarbonetos cuticulares tal como feito por Byrne *et al.* (1995) e Brown *et al.* (1998). A superfície externa de todos os insetos é coberta por uma camada de lipídios cuticulares compostos por uma mistura complexa de hidrocarbonetos que serve primariamente para limitar a perda de água (Blomquist & Dillwith, 1985; Hadley, 1985; Lockey, 1988; Howard, 1993). Alguns estudos têm mostrado que populações de insetos da mesma espécie, que estão localizadas em regiões geográficas separadas, podem ter um padrão distinto de composição de hidrocarbonetos na cutícula (Kamhawi *et al.*, 1987; Brown *et al.*, 1992; Rosa-Freitas *et al.*, 1992; Kruger & Pappas, 1993). Tal informação pode ser muito útil para determinar se houve deslocamento do corpo após a morte.

### 3 — OBJETIVOS GERAIS

Com base no que foi exposto, esta pesquisa teve como objetivo estudar aspectos da morfologia e da biologia das formas imaturas de 2 espécies de dípteros califorídeos de interesse para a área forense, a fim de se obterem dados necessários para estimar o tempo decorrido após a morte, salientando:

1. – o reconhecimento e a diferenciação das espécies *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) e *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani) quando estas se encontram em suas fases imaturas;
2. – a descrição morfológica de cada etapa do ciclo de vida dos imaturos de cada espécie;
3. – o uso de técnicas moleculares para auxiliar na identificação destas espécies;
4. – a aplicação de modelos matemáticos para a avaliação da idade cronológica destas espécies utilizando parâmetros biológicos como tempo de desenvolvimento, ganho e perda de massa corpórea e medidas de comprimento larvais.

#### **4 — DISTINÇÃO ENTRE AS FORMAS IMATURAS DE DUAS ESPÉCIES DE IMPORTÂNCIA FORENSE: *HEMILUCILIA SEGMENTARIA* E *HEMILUCILIA SEMIDIAPHANA* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)**

##### **4.1 — INTRODUÇÃO**

A decomposição animal se dá pela ação de vários organismos pertencentes a uma grande diversidade de grupos. Porém, no campo da Entomologia Forense, apenas os artrópodes e, mais especificamente, os insetos apresentam grande importância para a estimativa do intervalo pós-morte (IPM) através da análise faunística (Nuorteva, 1977; Smith, 1986; Catts & Goff, 1992).

Para uma apurada estimativa do IPM, a correta identificação dos insetos associados com a decomposição de carcaças é essencial, assim como o conhecimento do seu ciclo de vida e suas características ecológicas e biológicas (Nuorteva, 1977; Erzinçlioglu, 1983; Marchenko, 2001). A análise faunística envolve a correta identificação dos espécimes envolvidos e interpretação coerente das informações fornecidas por esses organismos presentes nos corpos.

Contudo, os insetos que ocorrem durante a decomposição cadavérica são mais difíceis de serem identificados, em nível de espécie, nos estágios imaturos do que no estágio adulto, especialmente os primeiros estádios. As razões são a diversidade e as minúsculas diferenças morfológicas, entre as várias espécies e entre as morfologicamente mais próximas, e estes fatos fazem com que uma rápida e apurada identificação destas espécies torne-se difícil, mesmo para taxonomistas bem treinados (Liu & Greenberg, 1989). Ainda assim, há poucos estudos que têm usado os aspectos morfológicos e comportamentais para identificar insetos nos seus estágios imaturos (Greenberg & Szyska,

1984; Liu & Greenberg, 1989; Erzinçlioglu, 1989; Greenberg, 1990; Amorim & Ribeiro, 2001; Wallman, 2001).

Ainda que a diversidade seja grande, existem algumas espécies que assumem um papel de maior relevância para as investigações criminais, especialmente as moscas necrófagas da família Calliphoridae, dada a sua abundância e por utilizarem a carcaça como substrato para oviposição e desenvolvimento.

Levantamentos recentes de dípteros necrófagos associados com carcaças de animais e cadáveres humanos na região de Campinas, São Paulo, têm identificado várias espécies de Calliphoridae envolvidas com a decomposição cadavérica (Monteiro-Filho & Penereiro, 1987; Souza & Linhares, 1997; Carvalho *et al.*, 2000; Thyssen, 2000; Carvalho & Linhares, 2001). Califorídeos da tribo Chrysomyini são representados no Novo Mundo por 20 espécies endêmicas encontradas em áreas tropicais e subtropicais (Dear, 1985).

*Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) e *H. semidiaphana* (Rondani), duas espécies endêmicas de califorídeos das Américas do Sul e Central estão associadas em grande número com ambientes naturais de floresta, mas em baixo número ou completamente ausente nas áreas urbanas e este é um valioso indicador de que o corpo tenha sido movido de um determinado habitat (Carvalho *et al.*, 2000). Além disso, elas são morfológica e comportamentalmente muito similares e utilizam os mesmos recursos, mas diferem nas suas taxas de crescimento e maturação. Estudos anteriores mostram que o tempo de desenvolvimento de *H. segmentaria* varia de 13-15 dias, enquanto que o de *H. semidiaphana* pode chegar a mais de 20 dias (Carvalho & Linhares, 2001).

Qualquer sistema ou forma de análise depende da disponibilidade de dados e a Entomologia Forense não é uma exceção. Por isso, uma identificação exata ou cuidadosa dos insetos necrófagos é de grande importância, já que poucos resultados reproduzíveis

poderiam ser obtidos antes de um adequado trabalho taxonômico ter sido realizado anteriormente tais como os de biologia e de análise molecular.

Assim, este estudo teve como objetivo descrever as formas imaturas das espécies *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* visando obter dados necessários para caracterizar e distinguir morfologicamente estas espécies e conseqüentemente contribuir na estimativa do IPM.

## 4.2 — MATERIAL E MÉTODOS

### *Obtenção dos exemplares para estudo*

Adultos de *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* foram coletados em ambiente de mata natural, com auxílio de um puçá, utilizando como iscas carcaças de ratos albinos (*Rattus norvegicus*) e de suínos (*Sus scrofa* L.). Logo que coletados, os insetos eram depositados em frascos cobertos por organza, sendo em seguida levados para o Laboratório de Entomologia do Departamento de Parasitologia da UNICAMP, onde foram anestesiados por aproximadamente 90 segundos, por meio de baixas temperaturas, e identificados.

Após a identificação, as espécies foram acondicionadas separadamente em gaiolas plásticas transparentes (30x30x50cm), com aberturas laterais revestidas com telas de náilon (Figura 1) e alimentados com dietas à base de açúcar e proteína, constituídas por solução açucarada e fígado bovino cru. Estas gaiolas permaneceram em sala climatizada no Laboratório de Criação de Larvas na UNICAMP, sob temperatura controlada de  $26\pm1^{\circ}\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas (fotofase-escotofase) e umidade relativa de  $70\pm10\%$ . Como substrato de oviposição foi oferecido carne bovina moída crua. Após a postura, os ovos foram retirados do substrato com auxílio de pincel fino e transferidos para frascos plásticos



apropriados (6x8cm), cobertos com organza (Figura 2), contendo dieta artificial proposta por Leal *et al.* (1982) numa proporção de 3,0g/ovo. Em cada frasco foram depositados cerca de 150 ovos, aproximadamente, sendo estes mantidos em câmara de germinação modelo Fanen 387 (Figura 3) sob temperatura controlada de  $26\pm1^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas (fotofase-escotofase) e umidade relativa de  $70\pm10\%$ , onde todas as etapas vitais foram acompanhadas.

**Figura 1:** Gaiola plástica transparente para criação e manutenção de indivíduos adultos de dípteros.



**Figura 2:** Frascos plásticos utilizados para criação de imaturos de dípteros.



**Figura 3:** Câmara climática de germinação modelo Fanen 387 utilizada para o desenvolvimento de imaturos de dípteros.



### ***Preparação de amostras***

Os ovos foram fixados diretamente em solução de etanol a 80%, após terem sido separados em  $\text{NaHSO}_3$  e lavados em água destilada.

As larvas correspondentes aos diferentes estádios de vida foram retiradas, no decorrer de seu desenvolvimento, lavadas em água destilada para retirar os resíduos de meio de cultura, mortas em água destilada aquecida a aproximadamente 70-80°C, por pelo menos 5 minutos, e transferidas para frascos contendo solução de álcool etílico a 70% para preservação do material. Alguns exemplares, destinados a estudos morfológicos mais detalhados, foram clarificados em solução de KOH (10%) durante 24 horas.

Os pupários foram fixados diretamente em álcool etílico a 70%.

### ***Medidas e desenhos***

As medidas foram realizadas a partir da observação de exemplares de imaturos de cada espécie com auxílio de uma câmara digital acoplada em um estereomicroscópio Zeiss® e do programa de medidas Image-Pro Lite 4.0® (Media Cybernetics, 1998). Os desenhos foram elaborados com auxílio de um estereomicroscópio Zeiss® juntamente com câmara clara acoplada.

Para a descrição dos ovos, larvas (esqueletos céfalo-faríngeos, bandas, tipos de espinhos, espiráculos anteriores e posteriores) e dos pupários foram utilizadas as terminologias adotadas por Shewell (1987).

### ***Microscopia eletrônica de varredura***

Para melhor caracterizar determinadas estruturas taxonômicas úteis para a identificação e reconhecimento das formas imaturas foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura (MEV).

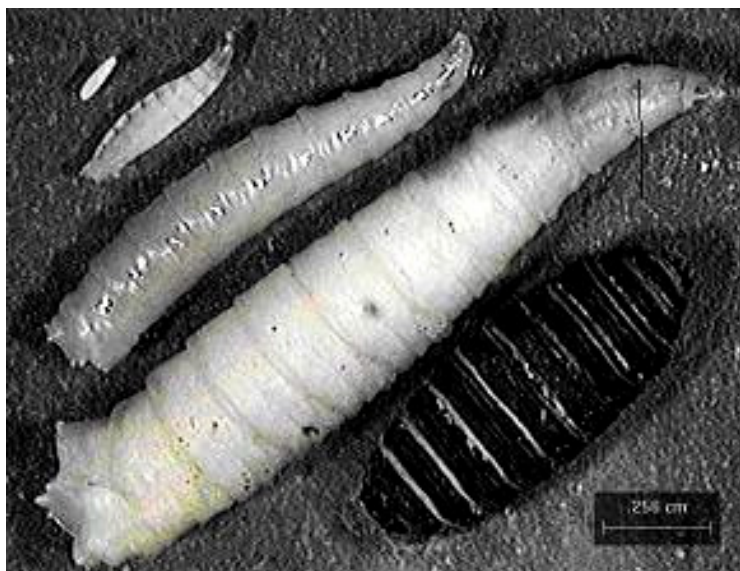
Para o exame em MEV foi empregada a metodologia proposta por Silveira (1998) na qual os exemplares previamente selecionados e limpos foram pré-fixados, lavados em solução tampão, pós-fixados em tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ), lavados novamente em solução tampão, impregnados com substâncias metálicas (ósmio-tanino-ósmio), desidratados em uma série de etanol em concentrações crescentes de 50, 70, 80, 95 e 100%, “secos” em câmara de “ponto crítico” (usando dióxido de carbono), montados de modo adequado no suporte porta-amostras do MEV (“stub”) com cola de prata coloidal em pasta e, finalmente, cobertos com uma fina camada de metal (ouro-paládio).

## **4.3 — RESULTADOS**

### ***Características das formas imaturas***

As larvas dos maiores grupos taxonômicos de Diptera diferem em importantes características morfológicas, entre elas a região cefálica e a forma do corpo (Daly *et al.*, 1978). Assim, todos os imaturos examinados são típicos do grupo Cyclorrapha (Figura 4) por serem vermiformes, acefálicos (sem diferenciação da cabeça) e por apresentarem partes bucais consistindo de ganchos orais curvados associados a escleritos internos.

**Figura 4:** Fases do ciclo de vida de *Hemilucilia segmentaria*.



#### *Descrição morfológica das formas imaturas*

##### *Hemilucilia segmentaria*

(Figuras 5-32)

##### **Ovo (n=80)**

Comprimento médio:  $1,27 \pm 0,03$  mm

Largura média:  $0,31 \pm 0,05$  mm

Coloração: branco-leitoso

Descrição: alongado de forma cilíndrica, com a superfície ventral ligeiramente convexa.

Metade anterior um pouco mais estreita que a metade posterior. Cório recoberto por um retículo fino, superficial e translúcido, permitindo visualizar o embrião no seu interior.

Micrópila simples, situada na porção apical anterior. Superfície dorsal com uma linha de

eclosão caracterizada por uma disjunção do cório que se inicia na região da micrópila e se estende até o terço posterior (Figuras 10 e 11).

### **Larva de primeiro estágio (n=60)**

Comprimento médio:  $3,12 \pm 0,01$  mm

Largura média:  $0,78 \pm 0,05$  mm

Coloração: branco-leitoso

Descrição: larva típica de *Cyclorrhapha*, cilíndrica, com a região anterior mais afilada que a posterior. O corpo compreende 12 segmentos sendo 1 formado pela cabeça, 3 torácicos e 8 abdominais. A cabeça é pouco desenvolvida e em sua face ventral encontra-se a abertura do canal alimentar. O esqueleto céfalo-faríngeo é de tamanho reduzido e formado por poucos escleritos (Figura 12). Ganchos orais pares, reduzidos a pequeno esclerito em forma de gancho, não articulados com os demais escleritos e pouco exteriorizados neste estágio. Faixas ou bandas de espinhos fracamente esclerotizados e orientados para trás (Figura 12). As bandas se iniciam no primeiro segmento torácico e estão completas até o quarto segmento. A primeira banda de espinhos é composta por 10 fileiras dispostas irregularmente, contendo em sua maioria espinhos múltiplos e alguns espinhos simples. As segunda, terceira e quarta bandas são compostas por 4-5 fileiras de espinhos, dispostos irregularmente, onde se encontram espinhos incompletos ou em formação sendo do tipo simples em sua grande maioria. A partir do quinto segmento apresenta banda de espinhos com uma descontinuidade que cresce à medida que os segmentos avançam, sendo a parte interrupta observada na parte ventral. Espiráculos anteriores ausentes. Espiráculos posteriores de tamanho bem reduzido, com uma única abertura estigmática indistinta e peritreme rudimentar (Figura 13).

### **Larva de segundo estágio (n=60)**

Comprimento médio:  $9,23 \pm 0,11$  mm

Largura média:  $1,61 \pm 0,06$  mm

Coloração: branco-leitoso a rosácea

Descrição: A cabeça apresenta um sulco longitudinal pouco proeminente mostrando a formação de dois lobos cefálicos. O esqueleto céfalo-faríngeo é semelhante ao de primeiro estágio, estando este mais esclerotizado e de tamanho maior com os escleritos mais evidentes (Figura 14). Ganchos orais bem desenvolvidos e recurvados. Esclerito intermediário (em forma de “H”) mais alongado. Espiráculos anteriores localizados lateralmente na região posterior do segundo segmento, com 11-13 projeções digitiformes onde se abrem as fendas espiraculares (Figura 15). Bandas de espinhos mais esclerotizadas que nas larvas de primeiro estágio, completas até o 6º segmento, dispostos irregularmente e compostos pelos mesmos tipos de espinhos descritos no estágio anterior. Espiráculos posteriores mais esclerotizados do que no primeiro estágio com peritrema visível, porém incompleto circulando aproximadamente um terço em volta das duas fendas estigmáticas que são alongadas (Figuras 16 e 17).

### **Larva de terceiro estágio (n=60)**

Comprimento médio:  $15,86 \pm 0,01$  mm

Largura média:  $3,15 \pm 0,01$  mm

Coloração: branco-leitoso a rosácea

Descrição: Esqueleto céfalo-faríngeo fortemente esclerotizado (Figura 18). Esclerito intermediário delgado quando visto de perfil e em forma de ‘H’ quando visto ventralmente (Figura 19). A cabeça apresenta lobos cefálicos mais pronunciados (Figura 20). Ganchos

orais recurvados anteriormente e com base alargada saindo do canal alimentar de forma mais evidente (Figura 21). Espiráculos anteriores com a mesma forma do estágio anterior, com 11-13 projeções digitiformes, um pouco maiores e apresentando sulcos espiraculares mais esclerotizados (Figuras 22 e 23). As bandas de espinhos seguem compostas com o mesmo número de fileiras descritos no estágio anterior, algumas contendo mais espinhos múltiplos (Figura 24) e outras mais do tipo simples (Figura 25), mais bem alinhados em sua maioria e sendo observadas faixas completas até o 8º segmento do corpo. A vista posterior do último segmento mostra 12 tubérculos, localizados ao redor da cavidade onde se encontram os espiráculos posteriores, distribuídos quase uniformemente, e uma placa anal bem aparente (Figura 26). Os espiráculos posteriores estão localizados póstero-dorsalmente no último segmento abdominal, fortemente esclerotizados, com o peritrema circundando as 3 fendas espiraculares, cada qual contendo projeções filamentosas em número variável, de forma quase completa, exceto por uma estreita fenda na parte mais estreita onde as pontas acabam de forma côncava (Figuras 26-28).

#### **Pupário (n=60)**

Comprimento médio:  $9,17 \pm 0,02$  mm

Largura média:  $3,6 \pm 0,05$  mm

Coloração: marrom escuro

Descrição: característico de *Cyclorrhapha*, em forma de barril (Figura 29), formado pela cutícula da larva de terceiro estágio, totalmente esclerotizada, com diminuição de comprimento em relação ao estágio anterior. A retração dos segmentos do corpo é evidenciada nas dobras laterais do corpo (Figura 30). Região anterior um pouco mais afilada que a posterior. Espiráculos anteriores localizados apicalmente na região anterior



(Figura 30). Bandas de espinhos com a mesma disposição que na larva de terceiro estágio sendo que as fileiras de espinhos estão mais aproximadas entre si e dobradas para dentro. Presença de cornos respiratórios (Figura 31). Espiráculos posteriores semelhantes aos da larva de terceiro estágio, porém mais aproximados entre si e mais esclerotizados (Figura 32).

## **Legenda referente às Figuras de 5-32 de *Hemilucilia segmentaria*:**

Figura 5: Desenho esquemático do ovo mostrando a linha de eclosão. Figura 6: Desenho esquemático da larva de 1º estágio mostrando em (A) vista dorsal, em (B) vista ventral, em (C) vista lateral, em (D) o esqueleto céfalo-faríngeo, em (E) os espiráculos posteriores e em (F) a região posterior. Figura 7: Desenho esquemático da larva de 2º estágio mostrando em (A) vista dorsal, em (B) vista ventral, em (C) vista lateral, em (D) o esqueleto céfalo-faríngeo, em (E) os espiráculos posteriores, em (F) o espiráculo anterior e em (G) a região posterior. Figura 8: Desenho esquemático da larva de 3º estágio mostrando em (A) vista dorsal, em (B) vista ventral, em (C) vista lateral, em (D) vista lateral do esqueleto céfalo-faríngeo, em (E) vista dorsal do esqueleto céfalo-faríngeo, em (F) o espiráculo posterior, em (G) o espiráculo anterior e em (H) a região posterior. Figura 9: Desenho esquemático do pupário mostrando em (A) vista dorsal, em (B) vista ventral, em (C) vista lateral, em (D) região anterior e em (E) a região posterior. Figura 10: Ovos. Figura 11: Ovo mostrando em detalhe a micrópila (MC) e a linha de eclosão (LE) por MEV\*. Figura 12: Região anterior da larva de 1º estágio mostrando em detalhe o esqueleto céfalo-faríngeo (ECF) e as primeiras bandas de espinhos (BE). Figura 13: Região posterior da larva de 1º estágio mostrando em detalhe o espiráculo posterior (ESP). Figura 14: Região anterior da larva de 2º estágio mostrando em detalhe o esqueleto céfalo-faríngeo (ECF) e o espiráculo anterior (ESA). Figura 15: Detalhe do espiráculo anterior com as projeções digitiformes (PDG). Figura 16: Região posterior da larva de 2º estágio mostrando em detalhe os espiráculos posteriores (ESP). Figura 17: Espiráculo posterior da larva de 2º estágio mostrando em detalhe o peritrema (PM) e as fendas estigmáticas (FEST). Figura 18: Região anterior da larva de 3º estágio mostrando em detalhe o esqueleto céfalo-faríngeo (ECF) e o espiráculo anterior (ESA). Figura 19: Esqueleto céfalo-faríngeo da larva de 3º estágio: vista lateral e dorsal. Figura 20: Região anterior da larva de 3º estágio mostrando em detalhe os lobos cefálicos (LCF) por MEV. Figura 21: Região anterior da larva de 3º estágio mostrando em detalhe o canal alimentar (CAL) por MEV. Figura 22: Espiráculo anterior da larva de 3º estágio por MEV. Figura 23: Espiráculo anterior da larva de 3º estágio mostrando em detalhe as projeções digitiformes (PDG) por MEV. Figura 24: Detalhe da primeira banda de espinhos em larva de 3º estágio: espinhos simples (ESP) e espinhos múltiplos (EMP) por MEV. Figura 25: Detalhe da segunda banda de espinhos em larva de 3º estágio por MEV. Figura 26: Região posterior da larva de 3º estágio mostrando em detalhe os espiráculos posteriores (ESP), a distribuição dos tubérculos (TBC) e a placa anal (PLA). Figura 27: Espiráculo posterior da larva de 3º estágio mostrando em detalhe o peritrema (PM) e as fendas estigmáticas (FEST). Figura 28: Espiráculo posterior da larva de 3º estágio mostrando em detalhe as projeções filamentosas (PJF) por MEV. Figura 29: Pupário. Figura 30: Pupário mostrando em detalhe as dobras do tegumento (DTG) e os espiráculos anteriores (ESA) por MEV. Figura 31: Pupário mostrando em detalhe os cornos respiratórios (CR) por MEV. Figura 32: Pupário mostrando em detalhe os espiráculos posteriores (ESP) por MEV.

---

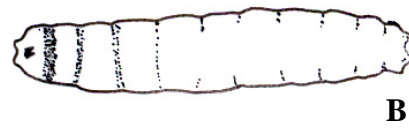
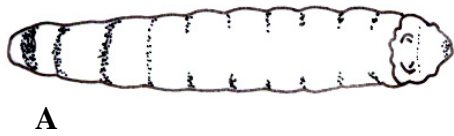
\* MEV: microscopia eletrônica de varredura.

5



0.5 mm

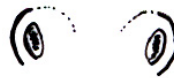
6



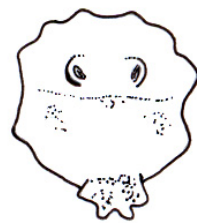
0.5 mm



0.1 mm

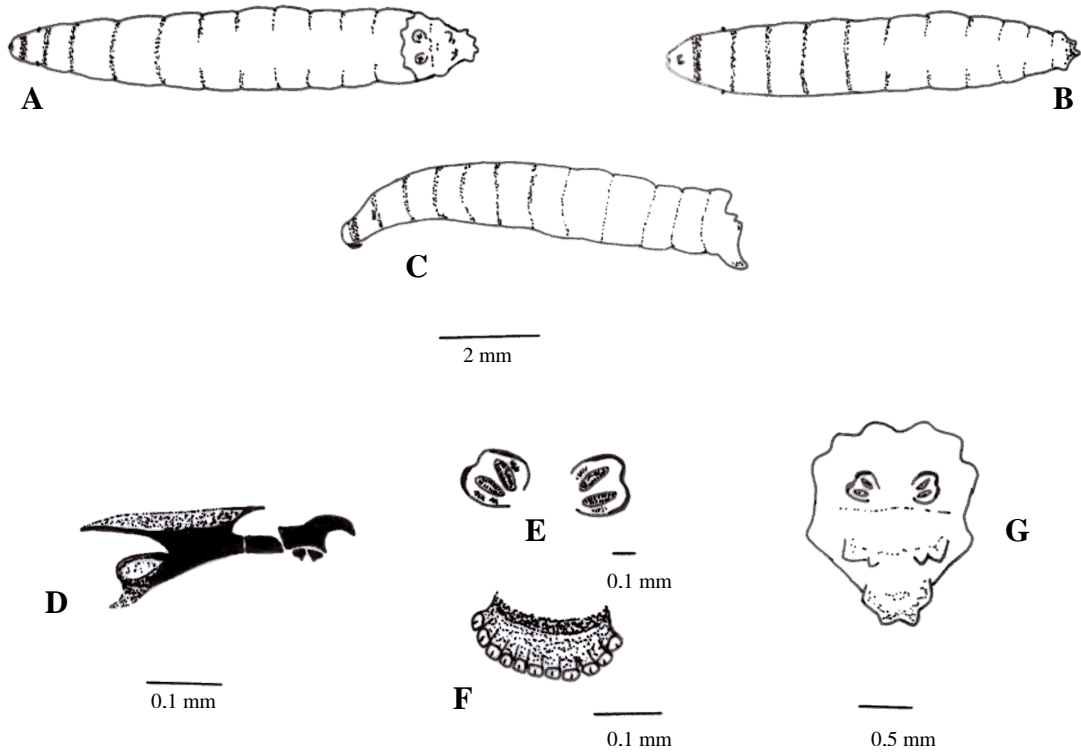


0.1 mm

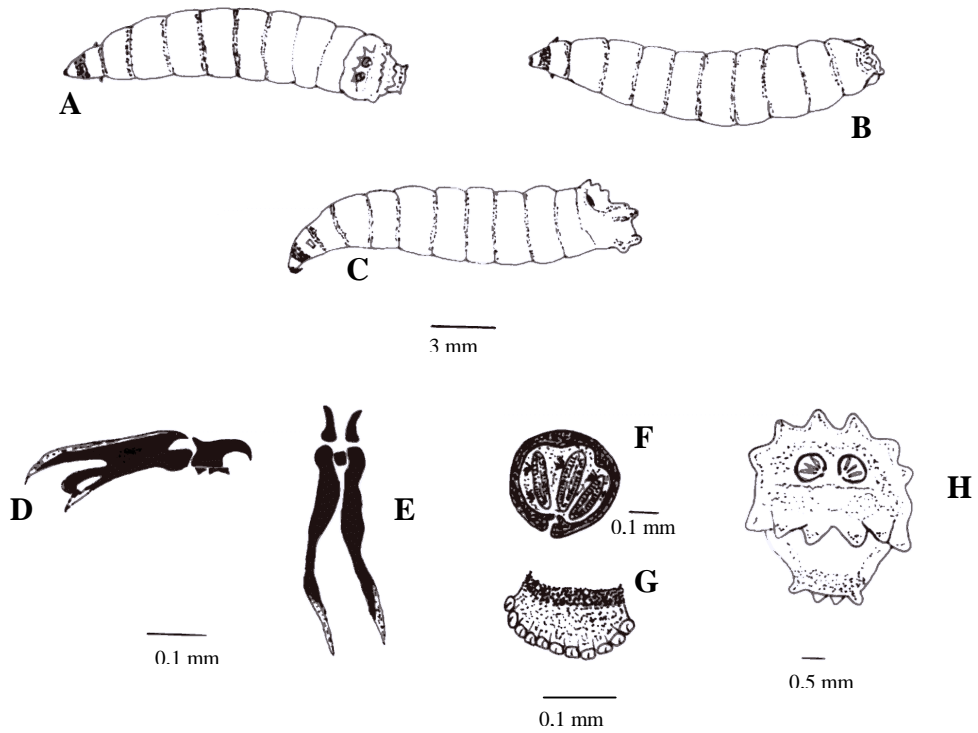


0.25 mm

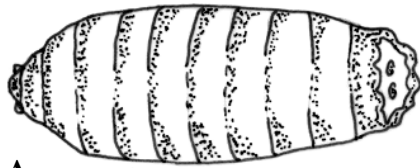
7



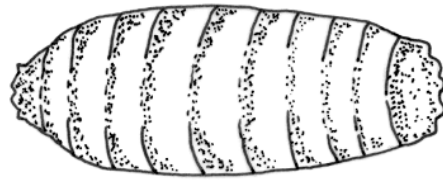
8



9

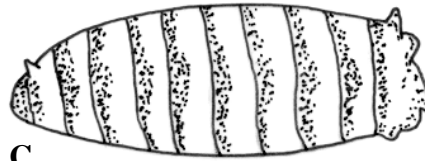


A



B

0.5 mm



C

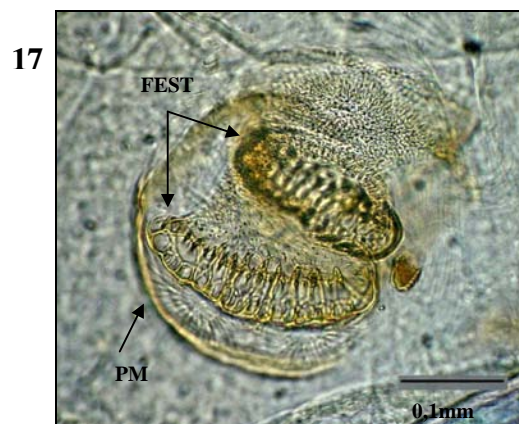
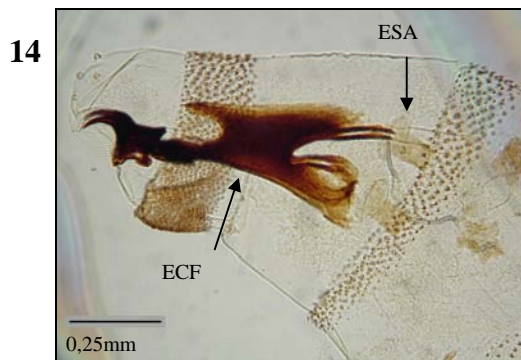
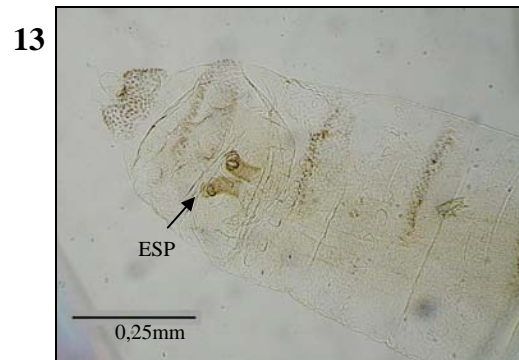
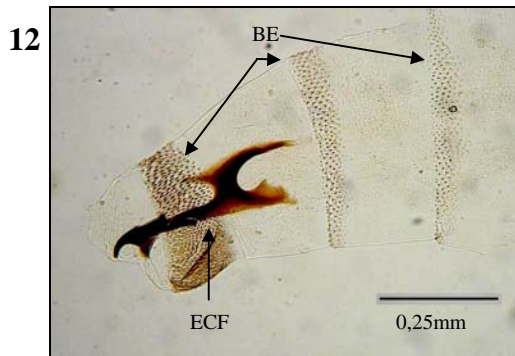
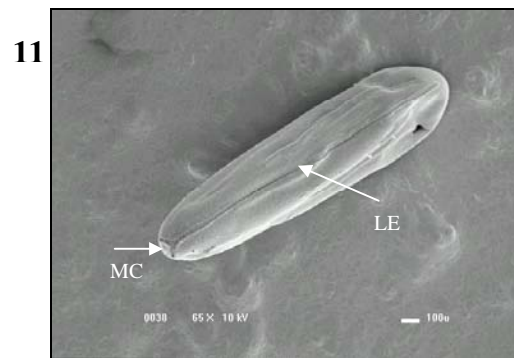
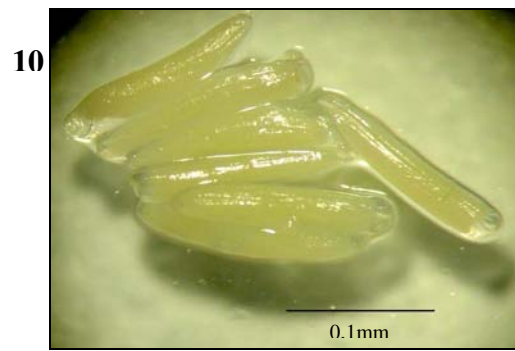


D



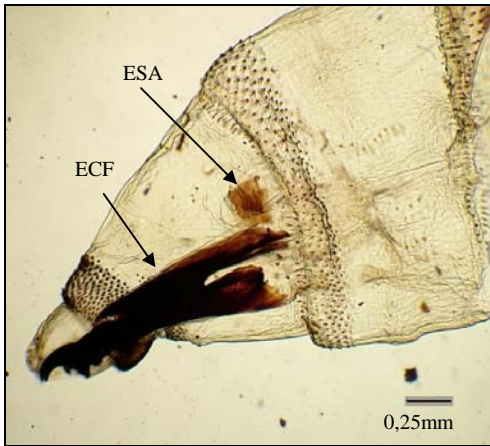
E

1 mm





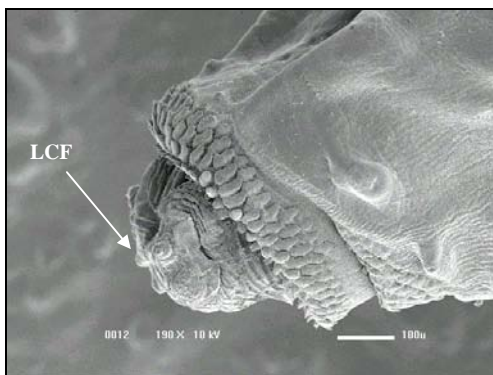
18



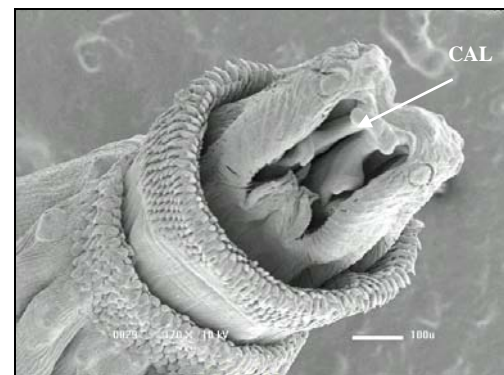
19



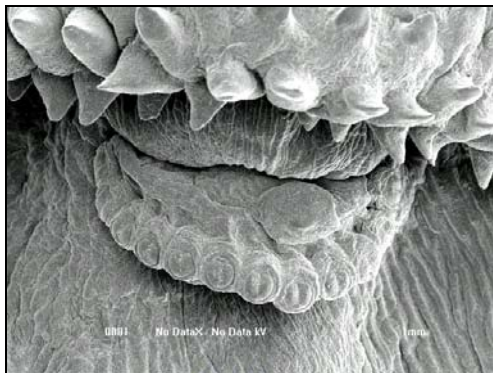
20



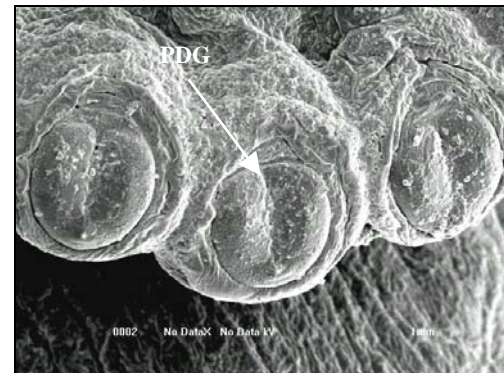
21



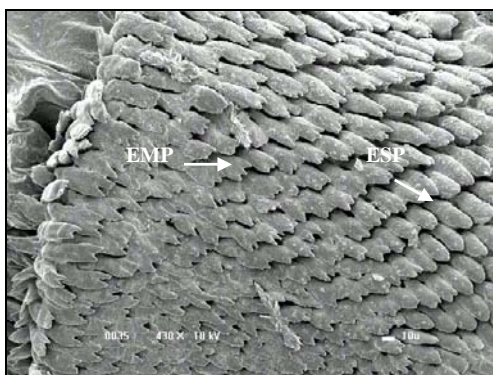
22



23



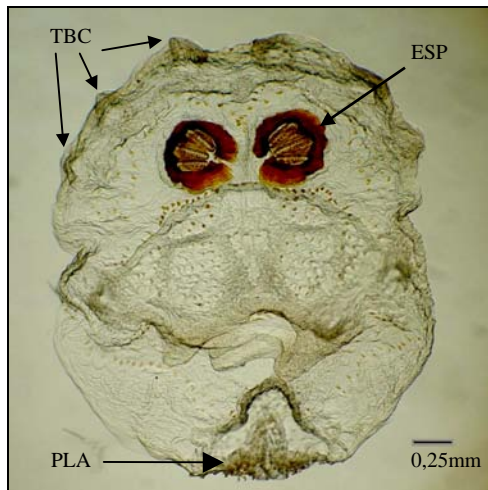
24



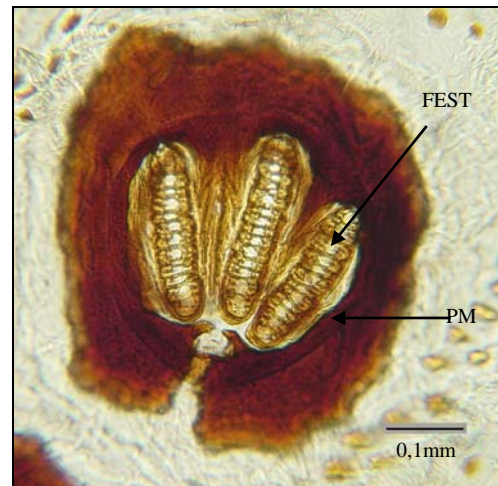
25



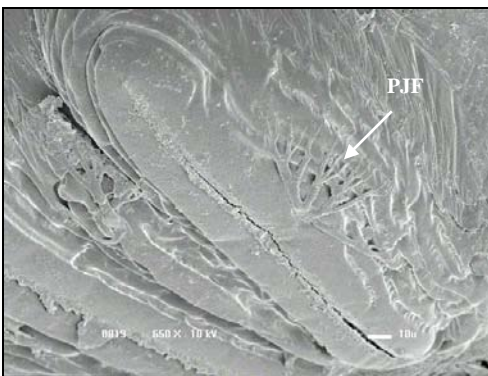
26



27



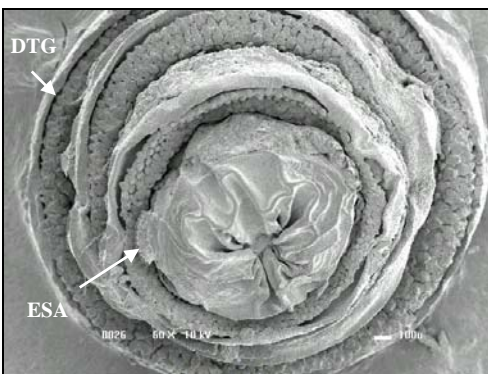
28



29



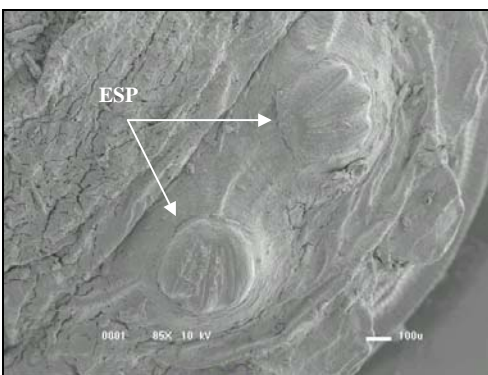
30



31



32





### ***Hemilucilia semidiaphana***

(Figuras 33-48)

#### **Ovo (n=50)**

Comprimento médio:  $1,21 \pm 0,03$  mm

Largura média:  $0,26 \pm 0,04$  mm

Coloração: branco-leitoso

Descrição: alongado de forma cilíndrica, com a superfície ventral ligeiramente convexa. Metade anterior um pouco mais estreita que a metade posterior. Cório recoberto por um retículo fino, superficial e translúcido, permitindo visualizar o embrião no seu interior. Micrópila simples, situada na porção apical anterior. Superfície dorsal com uma linha de eclosão caracterizada por uma disjunção do cório que se inicia na região da micrópila e se estende até o terço posterior (Figura 37).

#### **Larva de primeiro estágio (n=60)**

Comprimento médio:  $2,59 \pm 0,01$  mm

Largura média:  $0,46 \pm 0,02$  mm

Coloração: branco-leitoso

Descrição: larva típica de Cyclorrhapha, cilíndrica, com a região anterior mais afilada que a posterior. O corpo compreende 12 segmentos sendo 1 formado pela cabeça, 3 torácicos e 8 abdominais. A cabeça é pouco desenvolvida e dividida por um sulco longitudinal em 2 lobos cefálicos pouco pronunciados. O esqueleto céfalo-faríngeo é de tamanho reduzido e formado por poucos escleritos (Figura 38). Ganchos orais pares, reduzidos a pequeno esclerito em forma de gancho, não articulados com os demais escleritos. Esclerito

intermediário delgado. Bandas de espinhos fracamente esclerotizados, de forma simples e orientados para trás, completos até os 4 primeiros segmentos, mas com número irregular de fileiras (Figura 38). Espiráculos anteriores ausentes. Espiráculos posteriores de tamanho bem reduzido, com abertura estigmática indistinguível e vestígios de formação do peritrema (Figura 39).

#### **Larva de segundo estágio (n=60)**

Comprimento médio:  $7,2 \pm 0,06$  mm

Largura média:  $1,2 \pm 0,04$  mm

Coloração: branco-leitoso

Descrição: A cabeça apresenta um sulco longitudinal mais proeminente do que na larva de primeiro estágio, realçando um pouco mais os lobos cefálicos. Esqueleto céfalo-faríngeo semelhante ao de primeiro estágio, estando este um pouco mais esclerotizado e de tamanho maior com os escleritos mais evidentes (Figura 40). Ganchos orais mais desenvolvidos e recurvados. Esclerito intermediário em forma de “H” mais alongado. Espiráculos anteriores localizados lateralmente na região posterior do segundo segmento, com 10-13 projeções digitiformes de onde se abrem as fendas espiraculares (Figura 40). Bandas de espinhos mais esclerotizados que nas larvas de primeiro estágio, completas até o quinto segmento e também no 11º segmento, e nos demais segmentos ainda permanecem incompletas com fileiras irregulares e algumas com espinhos sem coloração. Pequenos tubérculos localizados ventralmente nos dois últimos segmentos. Espiráculos posteriores mais esclerotizados do que no primeiro estágio com peritrema incompleto e com 2 aberturas estigmáticas alongadas, revelando a presença de projeções filamentosas discretas e em número variável (Figura 41).

### **Larva de terceiro estágio (n=60)**

Comprimento médio:  $14,69 \pm 0,1$  mm

Largura média:  $2,3 \pm 0,02$  mm

Coloração: branco-leitoso

Descrição: A cabeça apresenta lobos cefálicos mais pronunciados devido ao sulco longitudinal ser mais profundo (Figura 42). Espiráculos anteriores com a mesma forma do estágio anterior, porém com projeções digitiformes maiores e sulcos espiraculares mais esclerotizados apresentando de 10-13 ramificações, sendo este número variável mesmo dentro do próprio espécime observado (Figura 43). Esqueleto céfalo-faríngeo fortemente esclerotizado com os ganchos orais recurvados anteriormente e com base alargada, saindo do canal alimentar mais pronunciado do que no estágio anterior (Figuras 43 e 44). As bandas de espinhos são compostas de muitos espinhos múltiplos e poucos espinhos simples, desalinhados, principalmente na face ventral, completos até o 7º segmento e também no 11º segmento. A vista posterior do último segmento mostra 12 tubérculos localizados ao redor da cavidade onde se encontram os espiráculos posteriores, estando distribuídos da seguinte forma: 6 localizados na região dorsal, agrupados 3 a 3, sendo a distância entre os trios maior que a distância entre os que se encontram agrupados; e 6 na região ventral, distribuídos com uniformidade, localizados próximos a placa anal, que é bem destacada e proeminente (Figura 45). A placa anal contém numerosos espinhos bem esclerotizados. Os espiráculos posteriores estão localizados póstero-dorsalmente no último segmento (Figura 45), mais esclerotizados que no estágio anterior, com peritrema circundando de forma quase completa as 3 fendas espiraculares, cada qual contendo projeções filamentosas que variam em número, encerrando na parte mais estreita do peritrema uma estrutura em forma de botão (Figuras 46 e 47).

**Pupário (n=60)**

Comprimento médio:  $8,2 \pm 0,07$  mm

Largura média:  $2,71 \pm 0,03$  mm

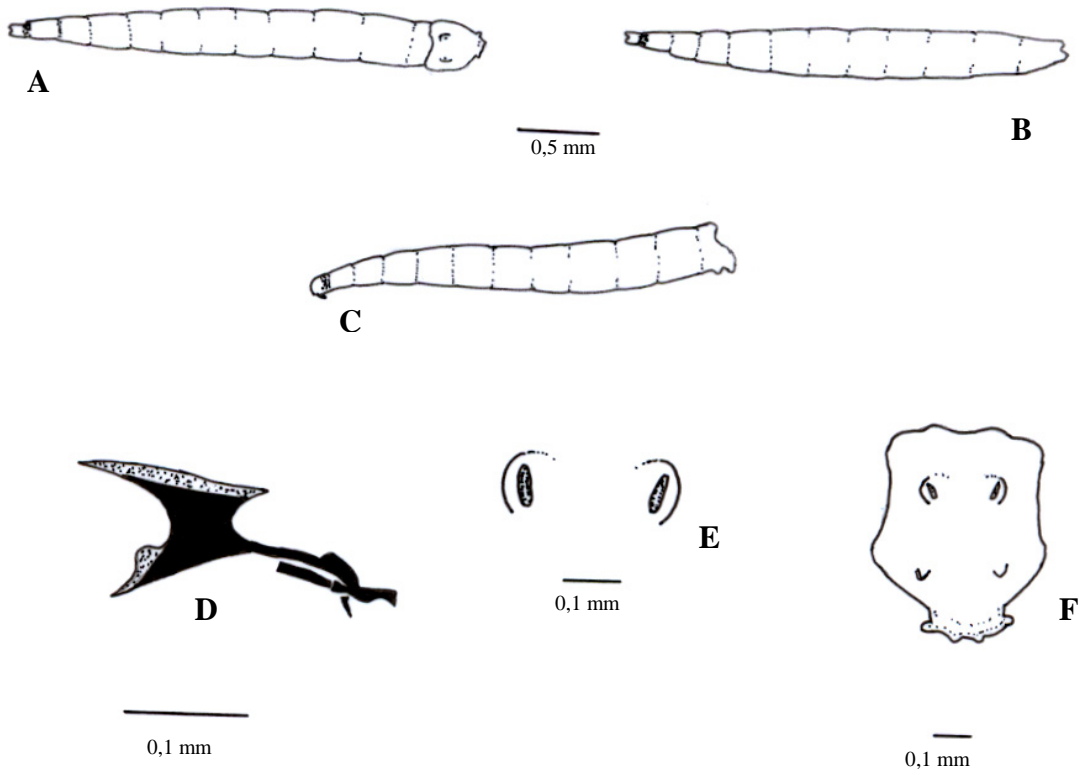
Coloração: marrom escuro

Descrição: característico de *Cyclorrhapha*, em forma de barril (Figura 48), formado pela cutícula da larva de terceiro estágio, totalmente esclerotizada, com diminuição de comprimento em relação ao estágio anterior. A retração dos segmentos do corpo é evidenciada nas dobras laterais do corpo. Região anterior mais afilada que a posterior e com os espiráculos anteriores dispostos apicalmente. Bandas de espinhos com a mesma disposição do estágio anterior sendo que as fileiras de espinhos estão mais aproximadas entre si. Espiráculos posteriores semelhantes aos do estágio anterior, porém mais aproximados entre si e mais esclerotizados, com presença de botão.

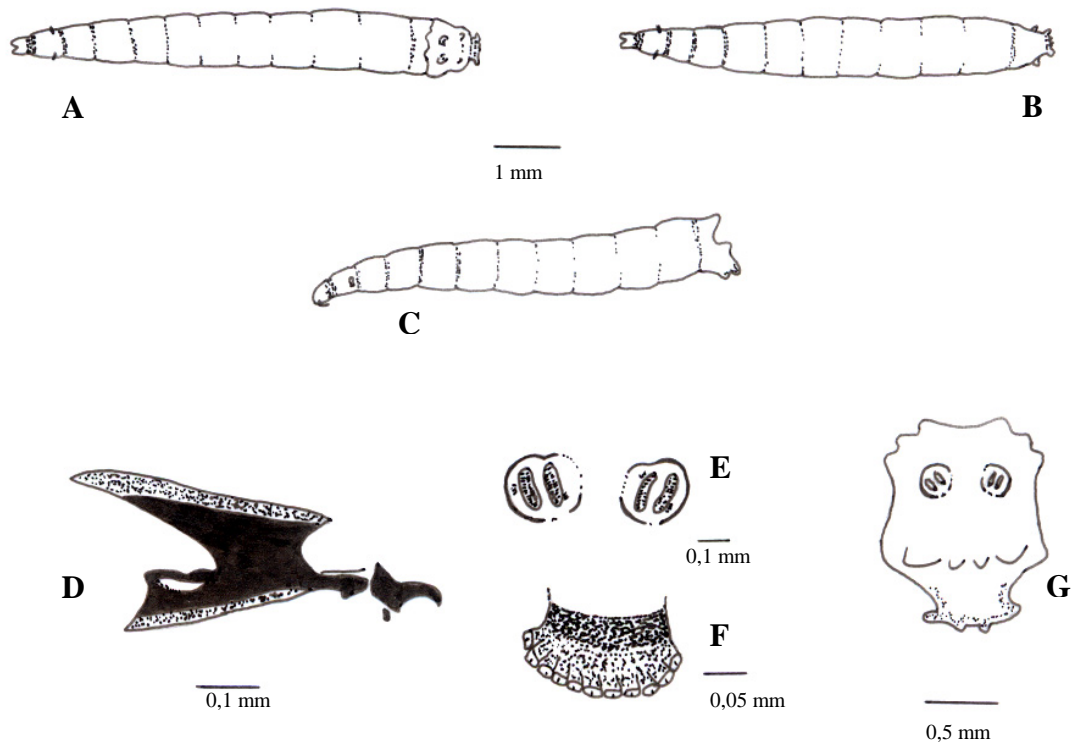
### **Legenda referente às Figuras de 33-48 de *Hemilucilia semidiaphana*:**

Figura 33: Desenho esquemático da larva de 1º estágio mostrando em (A) vista dorsal, em (B) vista ventral, em (C) vista lateral, em (D) o esqueleto céfalo-faríngeo, em (E) os espiráculos posteriores e em (F) a região posterior. Figura 34: Desenho esquemático da larva de 2º estágio mostrando em (A) vista dorsal, em (B) vista ventral, em (C) vista lateral, em (D) o esqueleto céfalo-faríngeo, em (E) os espiráculos posteriores, em (F) o espiráculo anterior e em (G) a região posterior. Figura 35: Desenho esquemático da larva de 3º estágio mostrando em (A) vista dorsal, em (B) vista ventral, em (C) vista lateral, em (D) vista lateral do esqueleto céfalo-faríngeo, em (E) vista dorsal do esqueleto céfalo-faríngeo, em (F) o espiráculo posterior, em (G) o espiráculo anterior e em (H) a região posterior. Figura 36: Desenho esquemático do pupário mostrando em (A) vista dorsal, em (B) vista ventral, em (C) vista lateral, em (D) região anterior e em (E) a região posterior. Figura 37: Ovo mostrando em detalhe a micrópila (MC) e a linha de eclosão (LE) por MEV. Figura 38: Região anterior da larva de 1º estágio mostrando em detalhe o esqueleto céfalo-faríngeo (ECF) e as primeiras bandas de espinhos (BE). Figura 39: Região posterior da larva de 1º estágio mostrando em detalhe o espiráculo posterior (ESP). Figura 40: Região anterior da larva de 2º estágio mostrando em detalhe o esqueleto céfalo-faríngeo (ECF) e o espiráculo anterior (ESA). Figura 41: Região posterior da larva de 2º estágio mostrando em detalhe os espiráculos posteriores (ESP). Figura 42: Região anterior da larva de 3º estágio mostrando em detalhe os lobos cefálicos (LCF) por MEV. Figura 43: Região anterior da larva de 3º estágio mostrando em detalhe o esqueleto céfalo-faríngeo (ECF) e o espiráculo anterior (ESA). Figura 44: Esqueleto céfalo-faríngeo da larva de 3º estágio: vista lateral e dorsal. Figura 45: Região posterior da larva de 3º estágio mostrando em detalhe os espiráculos posteriores (ESP), a distribuição dos tubérculos (TBC) e a placa anal (PLA). Figura 46: Espiráculo posterior da larva de 3º estágio mostrando em detalhe o peritrema (PM), as fendas estigmáticas (FEST) e o botão (BT). Figura 47: Espiráculo posterior da larva de 3º estágio mostrando em detalhe as projeções filamentosas (PJF) por MEV. Figura 48: Pupário.

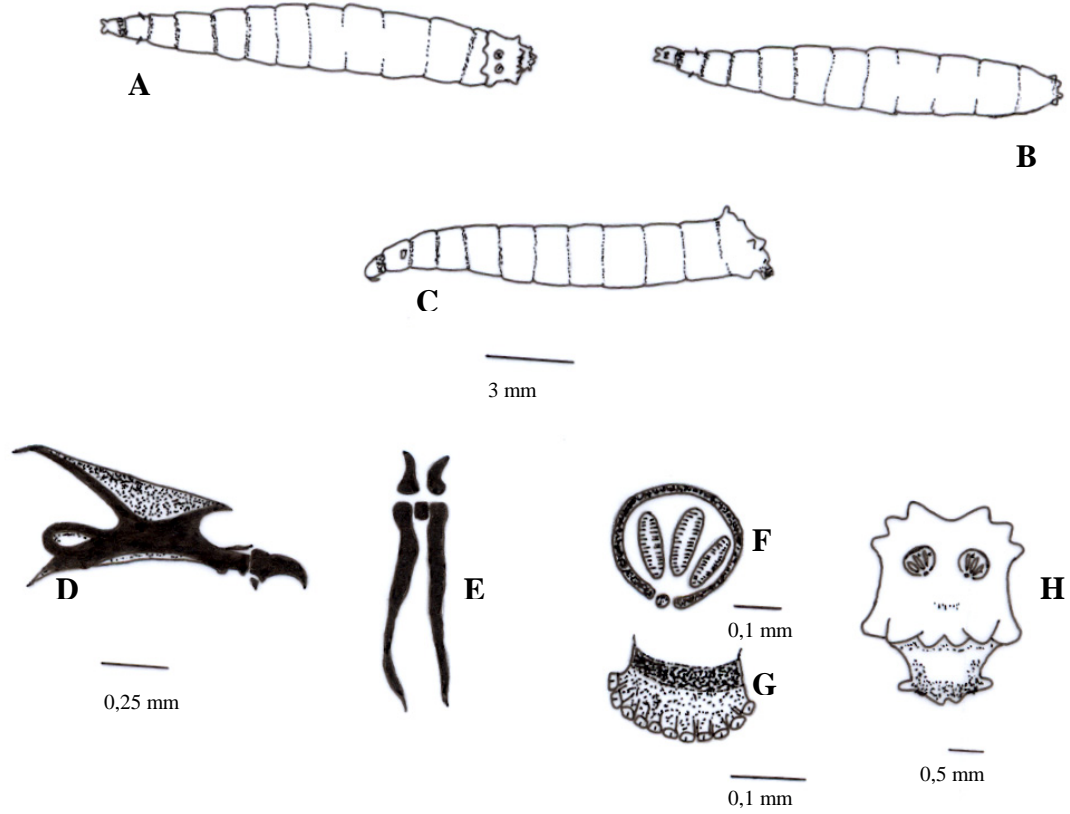
33



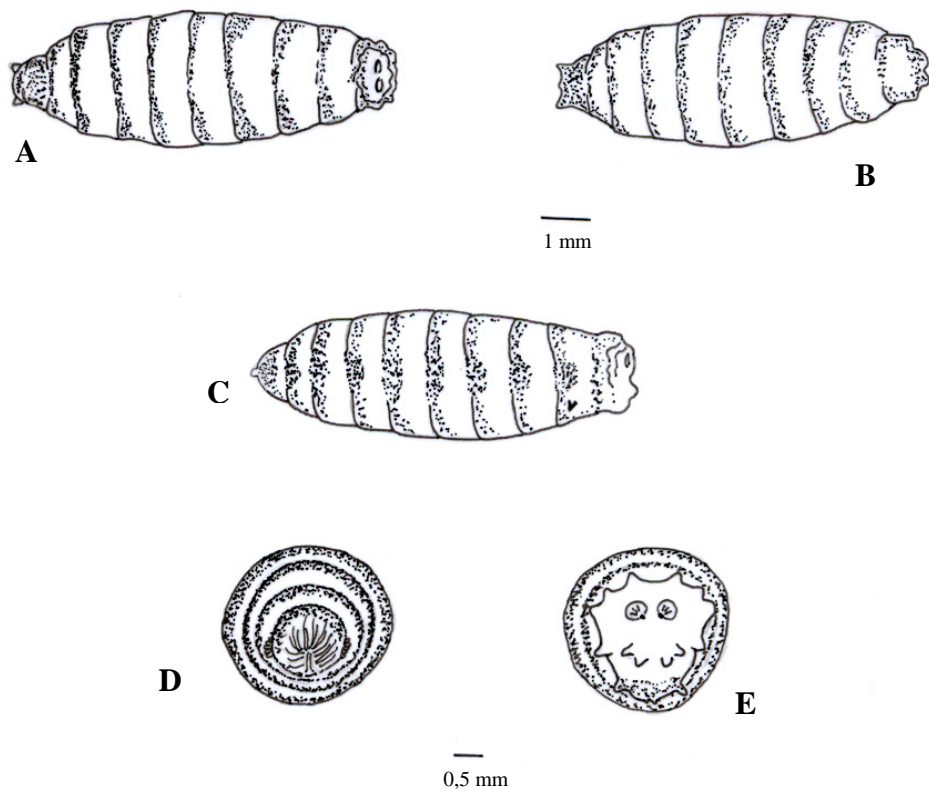
34



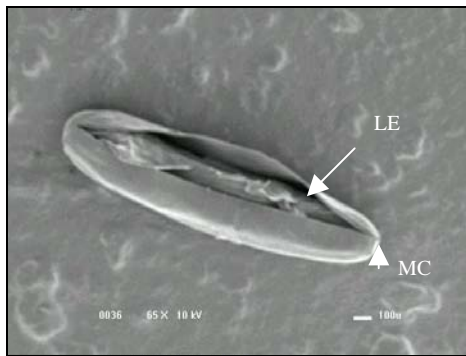
35



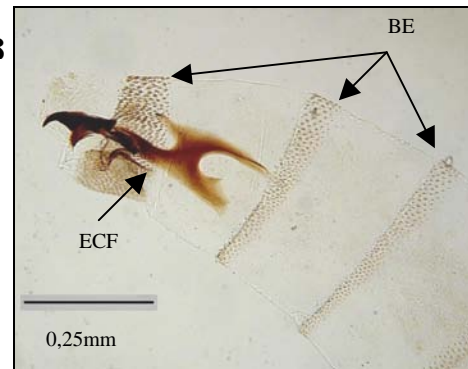
36



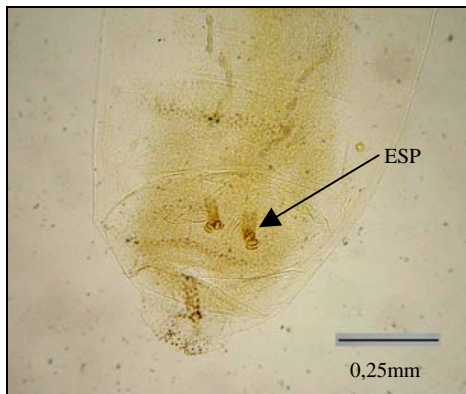
37



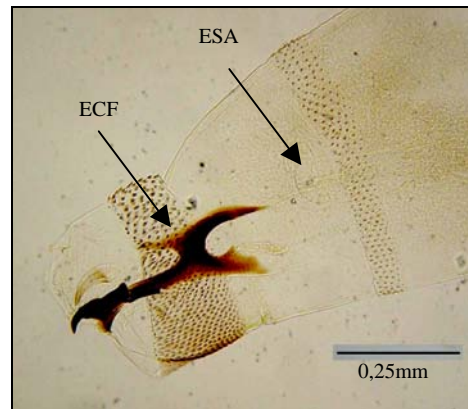
38



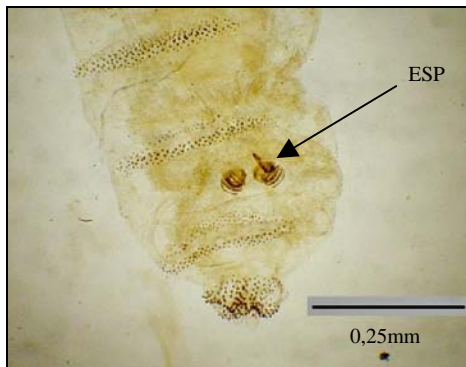
39



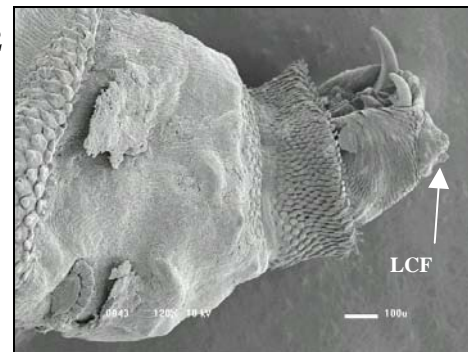
40



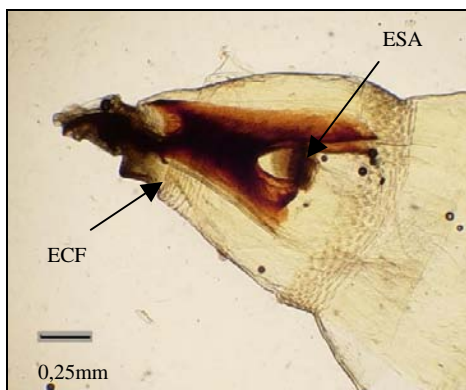
41



42



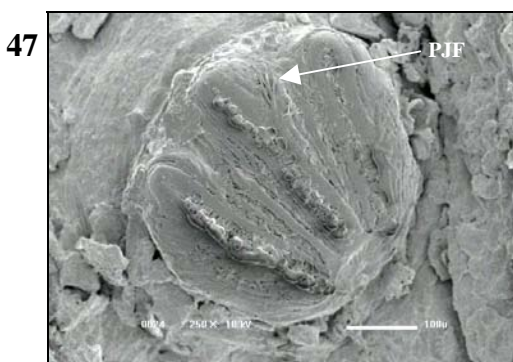
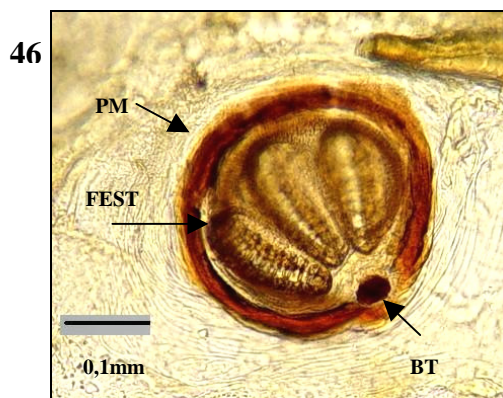
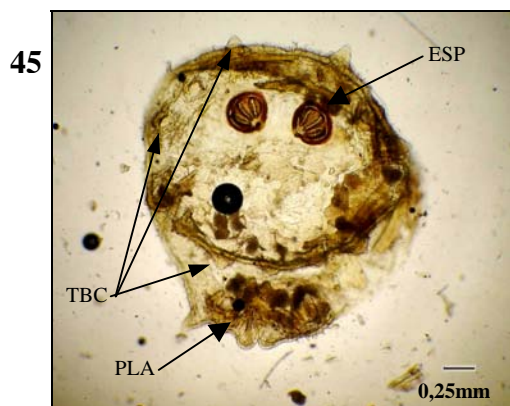
43



44







#### 4.4 — DISCUSSÃO

A morfologia externa de imaturos de *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* difere muito pouco entre os estádios e mesmo entre estas duas espécies. As diferenças observadas se dão principalmente quanto à distribuição dos tubérculos na região posterior do último segmento, quanto à estrutura do esqueleto céfalo-faríngeo e quanto à conformação do espiráculo posterior. As características aqui apontadas podem auxiliar na identificação destas duas espécies, desde que associadas às demais peculiaridades como distribuição geográfica, comportamento e hábitos alimentares, já que não divergem muito de algumas espécies da família Calliphoridae, especialmente dos gêneros *Lucilia*, *Paralucilia* e mesmo de outras espécies do gênero *Hemilucilia* que não são encontradas na região de estudo.

Comparando-se as estruturas dos esqueletos céfalo-faríngeos de *H. semidiaphana* do presente trabalho com as de *H. semidiaphana* (= *Hemilucilia flavifacies*) de Greenberg & Szyska (1984), pode-se concluir que não há diferenças morfológicas entre o material aqui estudado, do Brasil, com o material proveniente do Peru estudado por esses autores. Com relação à *H. segmentaria*, não se acham descritas suas formas imaturas na literatura para efeito de comparação.

Devido a falhas metodológicas na preparação de larvas de primeiro e segundo estágio, não foi possível a realização de um estudo mais aprofundado através de microscopia eletrônica de varredura. Apesar de Ferrar (1987) ressaltar que as fendas espiraculares são praticamente indistinguíveis por microscopia convencional, acredita-se que os espiráculos anteriores estejam realmente ausentes em imaturos de primeiro estágio das duas espécies.

A variação no número de projeções digitiformes dos espiráculos anteriores encontradas nas larvas das duas espécies estudadas pode se dar no mesmo indivíduo e nos sucessivos estádios, tornando este caráter de baixo valor para caracterização taxonômica. De acordo com Greenberg & Szyska (1984), a variação encontrada para *H. semidiaphana* foi de 9-11 ramificações sendo que neste estudo a faixa observada foi de 10-13. Quanto à distribuição das bandas de espinhos, os resultados obtidos são similares aos obtidos por estes mesmos autores.

Com relação aos espiráculos posteriores, somente a espécie *H. semidiaphana* apresentou um botão bem visível, sendo que este só pode ser visualizado entre a fase final do segundo estágio e início do terceiro. Esta estrutura não é nítida em microscopia eletrônica de varredura.

O pupário apresenta um par de cornos respiratórios da pupa, evertidos durante a pupariação, mais proeminentes e visíveis em *H. segmentaria* do que em *H. semidiaphana*.

## **5 — IDENTIFICAÇÃO DE DUAS MOSCAS NECRÓFAGAS DE IMPORTÂNCIA FORENSE — HEMILUCILIA SEGMENTARIA E HEMILUCILIA SEMIDIAPHANA (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) — USANDO MARCADORES MOLECULARES DO TIPO PCR-RFLP**

### **5.1 — INTRODUÇÃO**

Atualmente, o estudo de insetos necrófagos em Entomologia Forense tem fornecido informações úteis para investigações criminais (Nuorteva, 1977; Smith, 1986; Catts & Goff, 1992). Em particular, análises mais cuidadosas de insetos e outros artrópodes presentes em cadáveres permitem a determinação do tempo (intervalo pós-morte ou IPM), local e modo ou causa da morte, assim como qualquer movimento do corpo; com tais análises também é possível associar suspeitos com a cena do crime e investigar a ocorrência de substâncias tóxicas (Nuorteva, 1977; Smith, 1986; Catts & Haskell, 1990; Catts & Goff, 1992).

Para uma acurada estimativa do IPM, a correta identificação dos insetos associados com a decomposição é essencial, assim como o conhecimento do seu ciclo de vida e suas características ecológicas e biológicas (Nuorteva, 1977; Erzinçlioglu, 1983; Marchenko, 2001). A análise faunística envolve a correta identificação dos espécimes envolvidos e interpretação coerente das informações oferecidas por esses organismos presentes nos corpos.

Os insetos que ocorrem durante a decomposição cadavérica são mais difíceis de serem identificados, em nível de espécie, nos estágios imaturos do que no estágio adulto, especialmente os primeiros estádios. As razões são a diversidade e as minúsculas diferenças morfológicas entre as várias espécies, e estes fatos fazem com que uma rápida e apurada identificação destas espécies torne-se difícil, mesmo para taxonomistas bem treinados (Liu

& Greenberg, 1989). No entanto, há poucos estudos que têm usado os aspectos morfológicos e comportamentais para identificar insetos nos seus estágios imaturos (Greenberg & Szyska, 1984; Liu & Greenberg, 1989; Erzinçlioglu, 1989; Greenberg, 1990; Amorim & Ribeiro, 2001; Wallman, 2001). Mais recentemente, técnicas de biologia molecular têm sido usadas para identificar e diferenciar espécies de insetos que são importantes para a estimativa do IPM (Sperling *et al.*, 1994; Benecke, 1998; Malgorn & Coquoz, 1999; Wallman & Donnellan, 2001; Wells & Sperling, 2001; Wells *et al.*, 2001; Stevens & Wall, 2001; Harvey *et al.*, 2003; Zehner *et al.*, 2004).

Levantamentos recentes de dípteros necrófagos associados com carcaças de animais e cadáveres humanos na região de Campinas, São Paulo, têm identificado várias espécies de Calliphoridae que estão envolvidas com a decomposição cadavérica (Souza & Linhares, 1997; Carvalho *et al.*, 2000; Carvalho & Linhares, 2001). Califorídeos da tribo Chrysomyini são representados nas áreas tropicais e subtropicais do Novo Mundo por 20 espécies endêmicas pertencentes a 6 gêneros (Dear, 1985). Essas espécies são inicialmente e freqüentemente as mais importantes consumidoras de carcaças e estão presentes em todos os estágios de decomposição sendo, portanto, de potencial importância médico-legal.

O gênero *Hemilucilia* contém 6 espécies das quais pelo menos 4 são encontradas no Brasil, mas somente 2, *H. segmentaria* (Fabricius) e *H. semidiaphana* (Rondani), têm sido coletadas em nossa área de estudo. Uma terceira espécie a *H. benoisti* (Séguy) foi reportada por Séguy (1925) ocorrendo também no Estado de São Paulo, mas nunca mais foi coletada desde então. Tanto *H. segmentaria* quanto *H. semidiaphana* são encontradas nas Américas do Sul e Central, são assinantrópicas e muito abundantes em ambientes naturais de floresta, ocorrendo em baixo número ou completamente ausentes nas áreas urbanas. Este fato pode servir como indicador de que o corpo tenha ficado exposto, pelo menos por algum tempo,

em áreas florestais (Carvalho *et al.*, 2000; Carvalho & Linhares, 2001). Além disso, elas são morfológica e comportamentalmente muito similares e usam os mesmos recursos, mas diferem nas suas taxas de crescimento e maturação. Trabalhos anteriores feitos na mesma região, têm mostrado que o tempo de desenvolvimento de *H. segmentaria* varia de 13-15 dias, enquanto que o de *H. semidiaphana* pode chegar a mais de 20 dias a 18-22°C (Carvalho & Linhares, 2001).

O DNA mitocondrial (DNAMt) tem sido usado como um excelente marcador molecular na análise de variabilidade genética e polimorfismo em vários níveis de resolução taxonômica (Otranto & Stevens, 2002). Marcadores de DNAMt têm sido particularmente úteis em estudos comparativos por conta da organização simples e uniforme do genoma mitocondrial, o baixo número de recombinações e a alta taxa de substituições de nucleotídeos. Em adição, uma ampla gama de iniciadores universais estão disponíveis para o DNAMt de insetos (Simon *et al.*, 1993), permitindo assim amplificações confiáveis de genes ou regiões homólogas em vários grupos de insetos. A habilidade para recuperar eficientemente informações genéticas de amostras danificadas ou pobremente preservadas também facilita o uso de marcadores do DNAMt em investigações forenses (Junqueira *et al.*, 2002; Otranto & Stevens, 2002).

As análises de reação em cadeia da polimerase e do polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP) também têm sido usadas para identificar espécies proximamente relacionadas de importância forense em diferentes estágios de vida (Sperling *et al.*, 1994; Malgorn & Coquoz, 1999). Trata-se de uma técnica rápida, fácil e de baixo custo para propósitos de diagnóstico em rotina (Litjens *et al.*, 2001). Nas análises de PCR-RFLP, a detecção de padrões de polimorfismo entre indivíduos é baseada na diferença de

tamanho dos fragmentos de restrição gerados por uma endonuclease ou por um grupo de múltiplas endonucleases de restrição a partir de uma região amplificada de DNA.

A caracterização da subunidade I do gene mitocondrial Citocromo Oxidase (COI) tem sido amplamente usada para obter dados de identificação espécie-específicos baseados em técnicas de DNA incluindo espécies de importância forense (Sperling *et al.*, 1994; Malgorn & Coquoz, 1999; Wallman & Donnellan, 2001; Wells & Sperling, 2001; Harvey *et al.*, 2003). A região controle do DNAm (RC ou região rica em A+T-rich em insetos) é outra região rica em informações úteis para análises de PCR-RFLP (Litjens *et al.*, 2001), dada a variação genética alta por conta da natureza não-codificante dessa região.

Nesse estudo, foram usados marcadores moleculares de DNAm obtidos por meio de PCR-RFLP para identificar *H. segmentaria* e *H. semidiaphana*. Esses marcadores podem ser úteis por permitirem uma identificação rápida dessas espécies de importância forense, especialmente quando estas se encontram em seus estágios imaturos.

## 5.2 — MATERIAL E MÉTODOS

### *Amostras*

Amostras de 15 espécimes adultos de *H. segmentaria* e de 15 de *H. semidiaphana* foram obtidas nas cidades de Campinas, Jundiaí e Mogi Guaçu (n=45 de cada espécie da população do Estado de São Paulo) e somente amostras de *H. semidiaphana* foram obtidas em Manaus (n=15 da população do Estado do Amazonas), coletadas de 2000 a 2002, usando suínos como iscas.

Assim, um total de 105 exemplares foram usados nas análises de PCR-RFLP. Os espécimes foram identificados morfolologicamente usando chaves dicotômicas (Dear, 1985)

sendo preservados a -20°C e em álcool absoluto. As espécies foram armazenadas separadamente e etiquetadas de acordo com sua região geográfica de origem.

### ***Análise molecular***

#### **Extração de DNA**

O DNA genômico total foi extraído usando o método do fenol-clorofórmio e precipitação em álcool como descrito por Infante & Azeredo-Espin (1995). Neste método exemplares das duas espécies foram separados em 8 tubos corex siliconizados de 15ml contendo 1ml de tampão de homogeneização (10mM de Tris, 60mM de NaCl, 300mM de sacarose e 10mM de EDTA pH 7.5). Cada exemplar foi homogeneizado com ajuda de um macerador, em 1ml de tampão lise (300mM de Tris, 40mM de SDS, 20mM de EDTA e 0,7% do volume de DEPC), seguido de incubação no gelo por 15min. Em seguida foram adicionados a cada tubo 2ml de fenol equilibrado em tampão Tris 2M pH 8.0 sendo depois centrifugados por 10min a 5000 rpm (4°C). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo corex de 15ml. Foram adicionados volumes iguais de fenol e clorofórmio- álcool isoamílico (24:1). Cada tubo foi centrifugado novamente por 10min a 5000 rpm (4°C). Novamente o sobrenadante foi transferido para um novo tubo corex de 15ml sendo então adicionados 2ml de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) sendo centrifugados nas mesmas condições anteriores. No sobrenadante final foi adicionado 1,5ml de T.E. (1,0mM de Tris-HCl pH 7,4 e 0,1mM de EDTA pH 8,0), 150µl de NaOAc 3M e 9ml de etanol absoluto a -20°C, seguindo-se a incubação por 45min a -70°C. Após este período, os tubos foram centrifugados à 9000 rpm por 45min (4°C). O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspendido em 1ml de T.E., 50µl de NaOAc 3M e 2,75ml de etanol absoluto a -20°C,



seguindo-se a incubação por 45min a -70°C. Novamente após este período, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante descartado e os “pellets” de DNA secaram em temperatura ambiente sendo ressuspensos em 200µl de tampão estéril 1 x TE (1mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH 7.0). Todas as amostras de extração de DNA foram armazenadas a -20°C para posterior análise por PCR-RFLP.

### **Amplificação por PCR**

A região carboxi-terminal do gene COI e o domínio A da região controle (Lessinger & Azeredo-Espin, 2000) foram analisados. A região COI foi amplificada usando os iniciadores “universais” C1-J-2183 e TL2-N-3014 (Simon *et al.*, 1994) um grupo de oligonucleotídeos do DNAm e a RC foi amplificada usando os iniciadores TI-N-24 (Simon *et al.*, 1994) e CMEG-AR (Lessinger *et al.*, 2004).

As reações de amplificação foram feitas num volume final de 25µl contendo 10 x o tampão de PCR, 0.2mM de dNTPs, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5µM de cada iniciador, 1.25 unidades de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) e 2-4µl de DNA extraído. Para a região COI, os ciclos de temperatura incluíram um passo inicial de desnaturação de 3min a 94°C seguido por 34 ciclos de 1min a 94°C, um passo de anelamento de 1min a 42°C e um passo de extensão de 2min a 72°C. O último ciclo incluiu um passo de elongação de 7min a 72°C. Para a amplificação da região rica em A+T, foi dado um passo inicial de desnaturação de 4min a 94°C seguido por 34 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 45°C e 2 min de extensão a 60°C. O último ciclo incluiu um passo de elongação de 10min a 60°C. A baixa temperatura de extensão foi usada neste caso por conta da alta composição de A+T dessa região (Lessinger & Azeredo-Espin, 2000).

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (Sigma, USA) em tampão 1 x TAE (40mM Tris-acetate e 1mM EDTA, pH 8.0) a 80V, corados com brometo de etídeo (EtBr) e fotografados usando o sistema Polaroid. O tamanho dos fragmentos amplificados foram estimados por comparação com os marcadores padrão de peso molecular  $\Phi$ X174/*Hae*III e 1-kb DNA Ladder.

### **Digestão com endonucleases de restrição (RFLP)**

As seguintes enzimas de restrição foram usadas para digerir os produtos de PCR para subsequente análise por RFLP: *Dra*I, *Eco*RV, *Ssp*I e *Taq*I. Uma alíquota de 3 $\mu$ l de cada produto de PCR foi digerida em uma mistura de reação de 15 $\mu$ l de acordo com as instruções dos fabricantes (Invitrogen). Em seguida, a reação foi incubada a 37°C por 4h, e os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% a 60V. O tamanho dos fragmentos de restrição foram estimados graficamente usando um sistema de análise e documentação eletroforético Kodak® (EDAS 290) por comparação com marcadores padrão de peso molecular  $\Phi$ X174/*Hae*III e 1-kb DNA Ladder.

## **5.3 — RESULTADOS**

Produtos amplificados de aproximadamente 880 pb (pares de bases) foram recuperados da região COI nas duas espécies de *Hemilucilia*. Já para a região controle, produtos de aproximadamente 560 pb e 450 pb foram amplificados para *H. segmentaria* e *H. semidiaphana*, respectivamente (Figura 49), fornecendo uma identificação preliminar das espécies já que o tamanho da RC é conservado dentro das espécies.

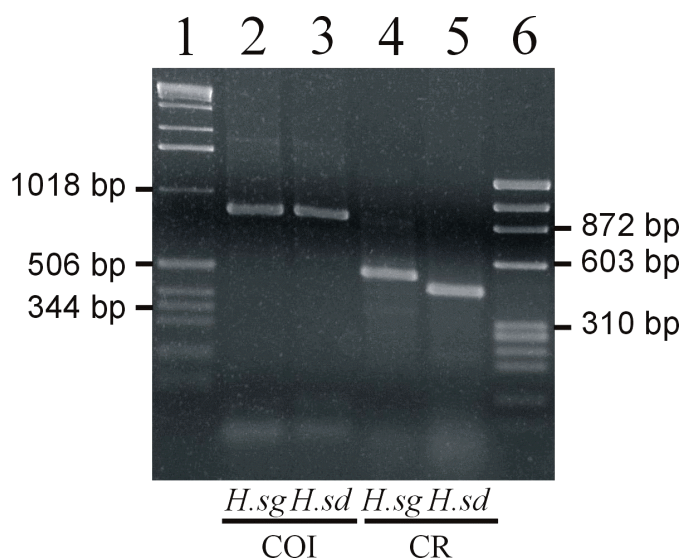
As seqüências amplificadas foram inicialmente analisadas com quatro endonucleases de restrição para identificar sítios diagnósticos. Esses resultados são

mostrados na Tabela 1. Entre os perfis de restrição dos produtos de PCR, digestões da RC com *DraI* e *SspI* e digestões de COI com *SspI* produziram padrões diagnósticos para uma identificação não ambígua dessas duas espécies de *Hemilucilia* (Figura 50).

A caracterização preliminar de sítios de restrição para *EcoRV* para as regiões COI e RC mitocondriais revelou a ocorrência de padrões polimórficos em COI (A e B, ver Tabela 1) e a não ocorrência de sítios de restrição para a RC de ambas espécies de *Hemilucilia* o que resulta uma identificação taxonômica ambígua.

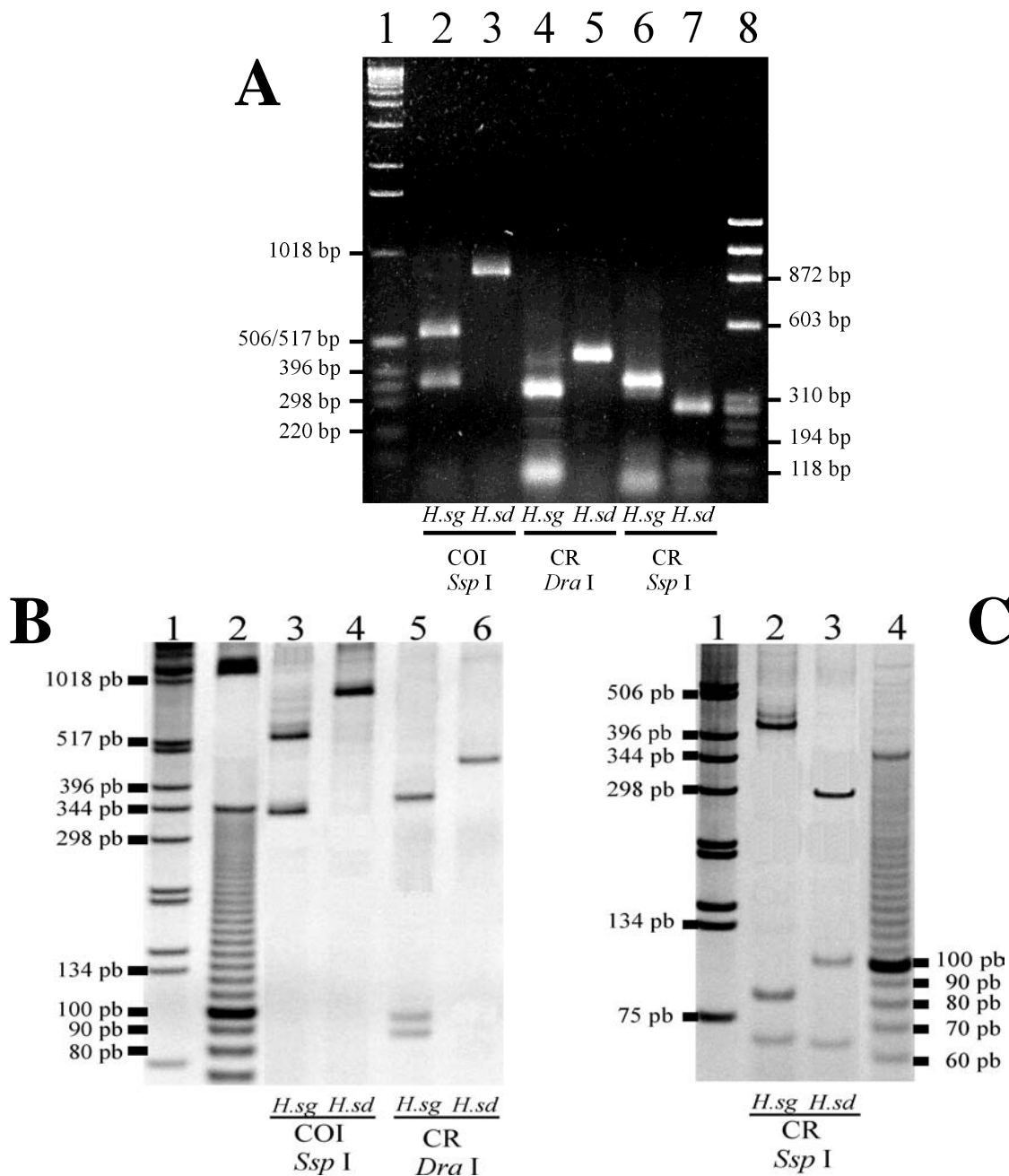
Apesar da presença de dois sítios de restrição para *TaqI* na região COI, ambas espécies de *Hemilucilia* mostraram o mesmo padrão monomórfico, o que não é útil quando usado como critério de identificação. Nenhum sítio para *TaqI* foi encontrado na RC dessas espécies.

**Figura 49:** Produtos amplificados das regiões COI e controle para *Hemilucilia segmentaria* (*Hsg*) e *Hemilucilia semidiaphana* (*Hsd*).



Em gel de agarose 2%: coluna 1: Marcador padrão de peso molecular 1 Kb DNA Ladder; colunas 2-3: amplificação de COI de *Hsg* e *Hsd*, respectivamente; colunas 4-5: amplificação da região controle de *Hsg* e *Hsd*, respectivamente; coluna 6: Marcador padrão de peso molecular  $\Phi$ X174/*HaeIII*.

**Figura 50:** Padrões diagnósticos de PCR-RFLP de amplificações de COI e da região controle (RC) para *Hemilucilia segmentaria* (Hsg) e *Hemilucilia semidiaphana* (Hsd).



Em A gel de agarose 2% e em B e C gel de acrilamida 10%. Em A: coluna 1: Marcador padrão de peso molecular 1 Kb DNA Ladder; colunas 2-3: Digestão da região COI usando enzima *Ssp*I para *Hsg* e *Hsd*, respectivamente; colunas 4-7: Digestão da RC para *Hsg* e *Hsd*, respectivamente; colunas 4-5: enzima *Dra*I; colunas 6-7: enzima *Ssp*I; coluna 8: Marcador padrão de peso molecular  $\Phi$ X174/*Hae*III. Em B: coluna 1: Marcador padrão de peso molecular 1 Kb DNA Ladder; coluna 2: Marcador padrão de peso molecular 10 bp DNA Ladder; colunas 3-6: Digestão da RC para *Hsg* e *Hsd*, respectivamente; colunas 3-4: enzima *Ssp*I; colunas 5-6: enzima *Dra*I. Em C: coluna 1: Marcador padrão de peso molecular 1 Kb DNA Ladder; colunas 2-3: Digestão da RC usando a enzima *Ssp*I para *Hsg* e *Hsd*, respectivamente; coluna 4: Marcador padrão de peso molecular 10 bp DNA Ladder.

**Tabela 1:** Caracterização de sítios de restrição para *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana*.

DNAmt	Enzimas de Restrição	<i>H. segmentaria</i> (n = 45)	<i>H. semidiaphana</i> (n = 60)
Regiões			
COI	<i>DraI</i> <sup>1</sup>	Não digerido	Não digerido
	<i>EcoRV</i> <sup>1</sup>	520 / 360 (A)	520 / 360 (A)
		Não digerido (B)	Não digerido (B)
	<i>SspI</i> <sup>*</sup>	<b>550 / 330</b>	<b>Não digerido</b>
	<i>TaqI</i> <sup>1</sup>	420 / 230 / 190	420 / 230 / 190
A+T	<i>DraI</i> <sup>*</sup>	<b>370 / 100 / 90</b>	<b>Não digerido</b>
	<i>EcoRV</i> <sup>1</sup>	Não digerido	Não digerido
	<i>SspI</i> <sup>*</sup>	<b>410 / 85 / 65</b>	<b>290 / 100 / 65</b>

(n) corresponde ao número de indivíduos analisados para cada espécie; <sup>1</sup>Essas enzimas foram testadas em somente 6 indivíduos de cada espécie durante a fase inicial de teste de sítios de restrição diagnósticos potenciais; (\*) indica padrões diagnósticos de PCR-RFLP úteis para a identificação espécie-específica; (A) e (B) denotam padrões polimórficos para *EcoRV*.

## 5.4 — DISCUSSÃO

A identificação molecular de espécies adultas ou imaturas relacionadas proximamente tem sido um elemento chave para a Entomologia Forense. Nos últimos dez anos, esta abordagem tem sido aplicada com muito sucesso para várias espécies e grupos de moscas de importância forense, especialmente para Calliphoridae e Sarcophagidae.

Como pode ser visto aqui, marcadores do tipo PCR-RFLP identificaram com sucesso *H. segmentaria* e *H. semidiaphana*, duas espécies de califorídeos relacionadas proximamente de importância forense no Brasil, as quais coexistem na mesma área

geográfica, mas não são facilmente distinguidas por critérios morfológicos nos seus estágios imaturos, embora seja possível separá-las de outras espécies de imaturos que se criam em carcaças.

Variações nas amplificações da RC forneceram um diagnóstico preliminar para a identificação das espécies de *Hemilucilia*. O tamanho da região controle em insetos varia consideravelmente em diferentes taxons e mesmo entre taxons relacionados proximamente (Zhang & Hewitt, 1997). Como um caráter expresso para genes mitocondriais codificantes, as amplificações de COI mostraram um tamanho conservado em ambas espécies de *Hemilucilia* (880 pb), um encontro que corrobora com o modelo estrutural dos genes COI de insetos (Lunt *et al.*, 1996).

A subunidade I do Citocromo Oxidase tem demonstrado ser particularmente confiável como marcador molecular para estudos de evolução e taxonomia em insetos (Lunt *et al.*, 1996; Caterino *et al.*, 2000). Além disso, análises de COI por PCR-RFLP têm fornecido marcadores diagnósticos para a identificação de espécies em muitos grupos diferentes (Simon *et al.*, 1993). A utilidade da RC como fonte de marcadores espécie-específicos em PCR-RFLP para a identificação de *Cochliomyia hominivorax* e *C. macellaria* no Brasil (Litjens *et al.*, 2001) e de espécies de Culicidae na Argentina (Duenas *et al.*, 2002) já foram bem demonstradas. Nesse estudo, o resultado de ambas regiões, COI e RC, por meio de PCR-RFLP identificam eficientemente estas duas espécies de *Hemilucilia*, seja em análises independentes (digestão de uma região específica) ou combinadas (múltiplas digestões em ambas regiões).

Comparações dos perfis de restrição de *digeridos* vs *não-digeridos* (COI/*SspI* e CR/*DraI*) permitiram de forma eficiente a identificação das duas espécies, entretanto, medidas adicionais devem ser usadas para evitar problemas com as reações de digestão, as

quais podem levar a erro de diagnóstico. Recomenda-se que um DNA controle (produto de PCR) de amostras conhecidas de *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* seja incluído nas reações de digestão como um parâmetro adicional na análise de amostras não identificadas. Amplificações da RC podem representar uma estratégia de grande valia para as ciências forenses por melhor recuperar, por meio de PCR, amostras inadequadamente preservadas. Além disso, digestões com *SspI* na RC fornecem o melhor marcador para identificação das duas espécies de *Hemilucilia*.

Os padrões de restrição diagnósticos foram monomórficos em todas as amostras analisadas, incluindo as 15 amostras da população do Amazonas. A conservação dos marcadores de PCR-RFLP entre os indivíduos analisados indica que esta aproximação fornece um meio confiável para a identificação dessas espécies.

Os resultados deste trabalho confirmam a utilidade de marcadores moleculares na identificação de moscas de importância forense no Brasil e representa o primeiro passo de uma investigação mais detalhada na identificação molecular de moscas causadoras de miíases. Tais abordagens podem ser úteis para a análise rotineira de demais dípteros neotropicais da fauna forense.

## **6 — O EFEITO DA TEMPERATURA NO TEMPO DE DESENVOLVIMENTO E DETERMINAÇÃO DAS EXIGÊNCIAS TÉRMICAS DOS ESTÁGIOS IMATUROS DE *HEMILUCILIA SEGMENTARIA* E *HEMILUCILIA SEMIDIAPHANA* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)**

### **6.1 — INTRODUÇÃO**

Os insetos, tal como ocorre com outros invertebrados, são classificados como poeiquilotérmicos, por apresentarem uma taxa de desenvolvimento que pode depender em maior ou menor intensidade das condições ambientais. Dentre os fatores ambientais, a temperatura é um dos mais relevantes, determinando importantes processos fisiológicos dos insetos como o metabolismo, influenciando diretamente no seu desenvolvimento (Wigglesworth, 1972), no comportamento (Sanders, 1975) e na maior ou menor adequação a determinado ambiente para o seu crescimento populacional (Salvadori & Parra, 1990).

Pesquisas têm demonstrado que diferentes espécies apresentam requisitos térmicos próprios (Logan *et al.*, 1976; Schoolfield *et al.*, 1981). Modelos de graus-horas ou de horas-acumuladas (também chamado de ADH), baseando-se nas exigências térmicas que o inseto necessita para completar determinada fase do seu ciclo de vida, são muito utilizados para determinar a ocorrência e o controle de insetos pragas na agricultura (Haddad *et al.*, 1999). Estes modelos também têm sido úteis para determinar a taxa de desenvolvimento de espécies de importância médico-legal (Greenberg, 1991; Byrd & Butler, 1998; Anderson, 1999; Marchenko, 2001; Grassberger & Reiter, 2002a e 2002b; Myskowiak & Doums, 2002; Lefebvre & Paquerault, 2004).

A entomologia forense, a qual pode ser definida como a aplicação do estudo de insetos e outros artrópodes com o propósito de descobrir informações úteis para uma



investigação, pode entre outras aplicações auxiliar na estimativa do tempo decorrido após a morte, o chamado intervalo pós-morte (IPM) (Smith, 1986).

Um dos métodos para estimar este intervalo consiste na determinação da idade de imaturos coletados num corpo (Catts & Haskell, 1990; Wells & LaMotte, 2001; Greenberg & Kunich, 2002; Amendt *et al.*, 2004). Para tanto, é essencial ao entomologista forense conhecer a biologia e o tempo de desenvolvimento das diferentes espécies necrófagas relacionados à sua história térmica. Eventualmente, a idade de uma espécie imatura também pode ser normalmente determinada por seu comprimento ou pela medida de sua massa corpórea (Greenberg & Kunich, 2002).

Em estudos realizados com suínos enfocando aspectos como decomposição e sucessão ecológica em ambiente de mata natural e reservas florestais no interior do Estado de São Paulo (Carvalho *et al.*, 2000; Thyssen, 2000; Carvalho & Linhares, 2001), duas espécies de califorídeos do gênero *Hemilucilia* se destacaram não só pela abundância e frequência com que apareciam na carcaça como por utilizarem esse substrato para oviposição, sendo consideradas de potencial importância forense na indicação do tempo de morte.

Assim, propôs-se desenvolver este estudo visando a determinação das exigências e do limiar térmico, por meio do modelo de ADH, para o desenvolvimento das formas imaturas de *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) e *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani), em condições de laboratório. Outros dados como comprimento e ganho e perda de massa corpórea também foram registrados no presente trabalho e equações matemáticas foram usadas para descrever a relação destes parâmetros com o tempo de desenvolvimento em função da temperatura. Por fim, os modelos obtidos foram comparados entre si com o fim

de obter dados necessários e o melhor ajuste matemático para estimar a idade de imaturos e inferir o intervalo pós-morte.

## **6.2 — MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Obtenção dos exemplares para estudo***

As formas de obtenção de adultos e imaturos já foram descritas no Material e Métodos do Item 4.2. Todos os exemplares imaturos, neste caso, foram mantidos em câmaras de germinação modelo Fanen 387 sob temperaturas controladas de 10, 15, 20, 25, 30 e  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas (fotofase-escotofase) e umidade relativa de  $70\pm 10\%$ , onde todas as etapas vitais foram acompanhadas.

### ***Parâmetros biológicos***

Em cada temperatura, foram observados parâmetros biológicos como a duração do período ovo-adulto, a percentagem de emergência (viabilidade), a razão sexual dos adultos emergidos, o ganho e perda de massa corpórea e a mensuração do comprimento dos imaturos.

### **Pesagem de imaturos**

A pesagem dos imaturos foi feita, 6h após a eclosão até a pupariação, em intervalos de 6h quando submetidos às temperaturas de  $20\text{-}35^{\circ}\text{C}$  e em intervalos de 12h a  $10$  e  $15^{\circ}\text{C}$ , por ser o desenvolvimento mais lento nestas condições. Todos os espécimes, antes da pesagem, foram lavados em água destilada para retirar os resíduos da dieta e secos em

papel filtro. As pesagens foram feitas utilizando-se uma balança de precisão da Scientech modelo SA 210.

Após a pesagem, os imaturos não eram devolvidos aos potes sendo mortos em água destilada aquecida a aproximadamente 70-80°C, por pelo menos 5 minutos, e transferidos para frascos contendo solução de álcool etílico a 70% para preservação do material a ser posteriormente mensurado. Os pupários foram fixados diretamente em álcool etílico a 70%.

### **Mensurações**

As medidas do comprimento para cada espécie submetida às diferentes temperaturas foram realizadas com auxílio de uma câmara digital acoplada em uma lupa Zeiss® e do programa de medidas Image-Pro Lite 4.0® (Media Cybernetics, 1998).

### ***Cálculo das exigências térmicas – Modelos de graus-horas ou horas-acumuladas (ADH)***

O cálculo do limiar térmico inferior ou temperatura basal (tb), da constante térmica (K) e da velocidade de desenvolvimento foram feitos utilizando-se o método da hipérbole proposto por Haddad *et al.* (1999), para cada estágio, com base no tempo de duração de cada etapa e para o desenvolvimento total compreendendo o período de ovo até emergência do adulto, para as diferentes temperaturas testadas. Para comparar possíveis diferenças entre os valores observados e os estimados para cada equação foi utilizado o teste de  $\chi^2$ .

### ***Relação temperatura vs desenvolvimento vs variáveis biológicas***

Para a análise do desenvolvimento de cada espécie em relação as diferentes temperaturas de criação, modelos de regressão foram propostos assumindo como variável dependente o tempo total de desenvolvimento (compreende o intervalo que o imaturo leva

para sair do ovo até a sua emergência, sem considerar o tempo de vida enquanto indivíduo adulto) e como variável independente, a temperatura. Variáveis biológicas, como peso e comprimento (estas observações restritas para os estádios larvais), também foram analisadas por modelos de regressão, em relação ao tempo total de desenvolvimento (variável independente) em diferentes temperaturas, para obtenção de modelos para a estimativa de idade. Todos os testes estatísticos foram feitos utilizando-se o procedimento PROC GLM do pacote estatístico SAS® (SAS Institute Inc., 1996). Para comparar possíveis diferenças entre os valores observados e os estimados para cada equação foi utilizado o teste F de comparações múltiplas.

### **6.3 — RESULTADOS**

#### ***Parâmetros biológicos***

Neste estudo, observou-se que o tempo de desenvolvimento de ovo até adulto para as duas espécies de *Hemilucilia* diminuiu conforme as temperaturas se elevavam (Tabelas 2 e 3). Pelo teste de correlação de Pearson, houve correlação inversa entre a duração do ciclo e o aumento de temperatura em todas as faixas térmicas estudadas para *H. segmentaria* ( $r = -0,9257$ ;  $p = 0,0240$ ) e *H. semidiaphana* ( $r = -0,9819$ ;  $p = 0,0029$ ).

Também foi observada uma discreta alteração nos intervalos entre um estágio e outro nas diferentes temperaturas para as duas espécies, caracterizadas pelas mudanças morfológicas ocorridas nos imaturos, tais como aparecimento dos espiráculos anteriores, diferenciações nos espiráculos posteriores, alterações e formações das bandas de espinhos e modificações de estruturas internas como o esqueleto céfalo-faríngeo.

O período de eclosão dos imaturos não apresentou grande variação, tendo sido este observado ocorrer numa faixa de 11-16 horas para *H. segmentaria* e de 18-22 horas para *H. semidiaphana*. Já na temperatura de 10°C, não foi observada a eclosão de nenhum exemplar de *H. semidiaphana*.

Nas faixas térmicas de 10 e 15°C, observou-se que a longevidade de *H. semidiaphana* foi mais afetada do que a de *H. segmentaria*, apresentando um desenvolvimento ainda que incompleto à 10°C até o 3º estágio larval, caracterizado por alterações morfológicas pouco significativas em relação ao comprimento e peso, até a mortalidade de todos exemplares.

Com relação a viabilidade, em 15°C, *H. segmentaria* apresentou uma taxa de emergência de 63,2% e *H. semidiaphana* registrou uma taxa de 27,6%. Nas demais temperaturas estas taxas variaram entre 71,4-80,4% para as duas espécies.

A razão sexual dos adultos emergidos não diferiu para nenhuma das espécies expostas às diferentes condições térmicas, tendo sido registrada uma proporção de 2:1 sobressaindo em maior número as fêmeas.

**Tabela 2:** Duração média, em horas, do tempo de vida total (ovo-adulto) e de cada estágio imaturo de *Hemilucilia segmentaria* submetida a diferentes temperaturas.

Temperaturas °C	Eclosão	1º estágio	2º estágio	3º estágio	Pré-pupa	Pupa	Ovo-adulto
10	16±1,39	48±1,05	72±2,25	198±5,27	-	-	334±10,98*
15	16±1,15	36±1,21	48±1,39	144±5,89	54±2,15	154±4,81	452±8,49
20	14±1,00	24±0,95	30±1,05	102±6,09	30±1,12	142±6,33	342±7,23
25	12±0,49	18±1,05	24±1,58	96±5,42	24±1,16	136±5,42	310±6,98
30	12±2,39	12±1,02	18±1,32	96±6,58	24±1,19	136±4,81	298±6,58
35	11±1,56	12±1,25	18±1,02	90±3,41	24±1,31	106±3,26	261±6,13

\* Tempo total de desenvolvimento onde foi registrada uma taxa de mortalidade de 100% no 3º estágio larval.

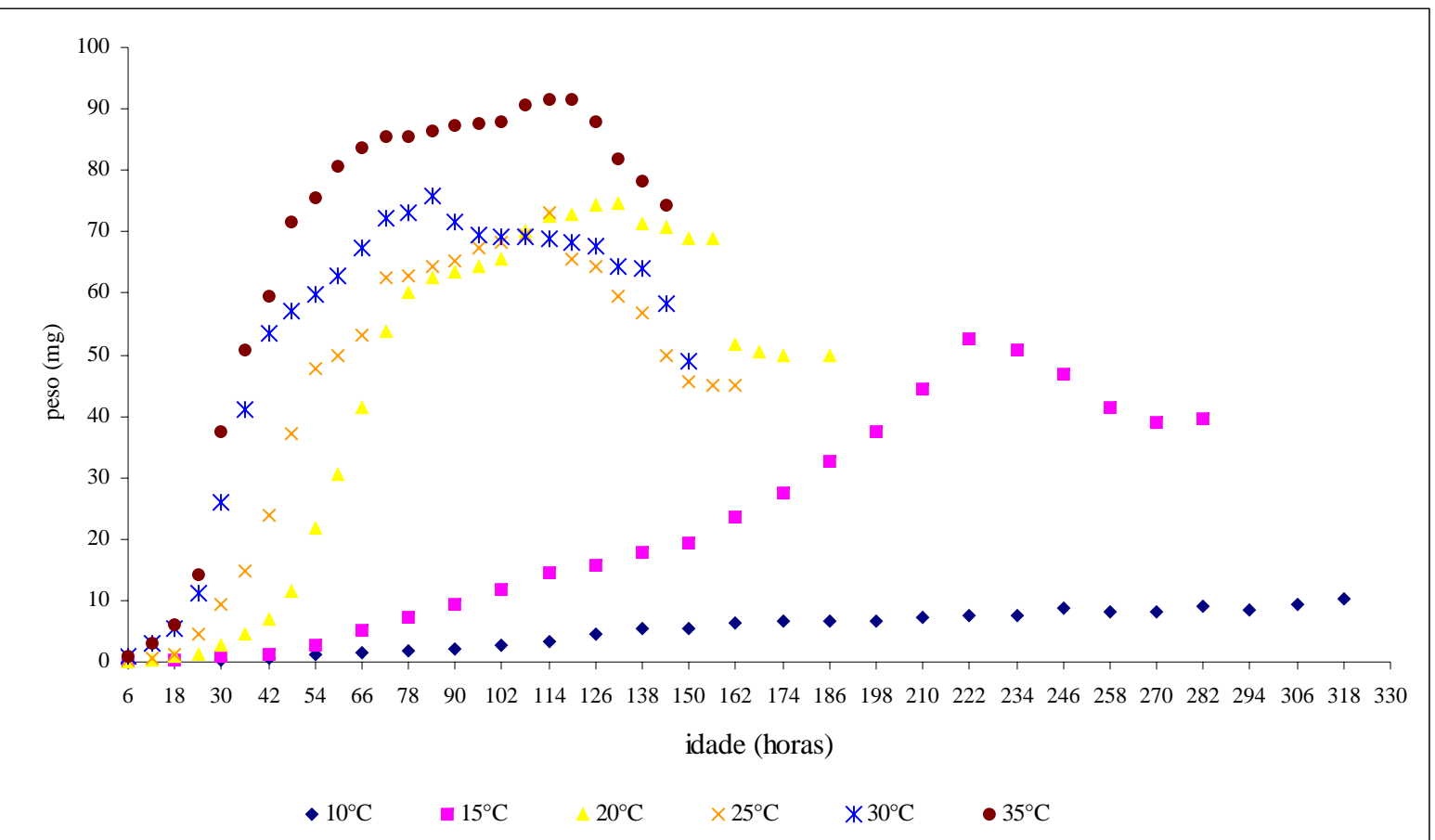
**Tabela 3:** Duração média, em horas, do tempo de vida total (ovo-adulto) e de cada estágio imaturo de *Hemilucilia semidiaphana* submetida a diferentes temperaturas.

Temperaturas °C	Eclosão	1º estágio	2º estágio	3º estágio	Pré-pupa	Pupa	Ovo-adulto
10*	-	-	-	-	-	-	-
15	22±2,28	30±1,24	54±1,37	174±4,43	42±1,52	268±3,42	558±5,27
20	20±1,90	24±2,27	36±2,87	114±4,59	36±2,60	244±3,89	474±6,09
25	19±1,40	18±2,82	30±0,54	108±3,88	24±0,43	232±4,23	431±4,17
30	19±1,63	12±2,15	30±1,58	102±4,00	24±1,21	206±4,28	393±5,57
35	18±1,12	12±1,91	24±1,09	88±4,57	18±1,09	196±3,13	356±3,98

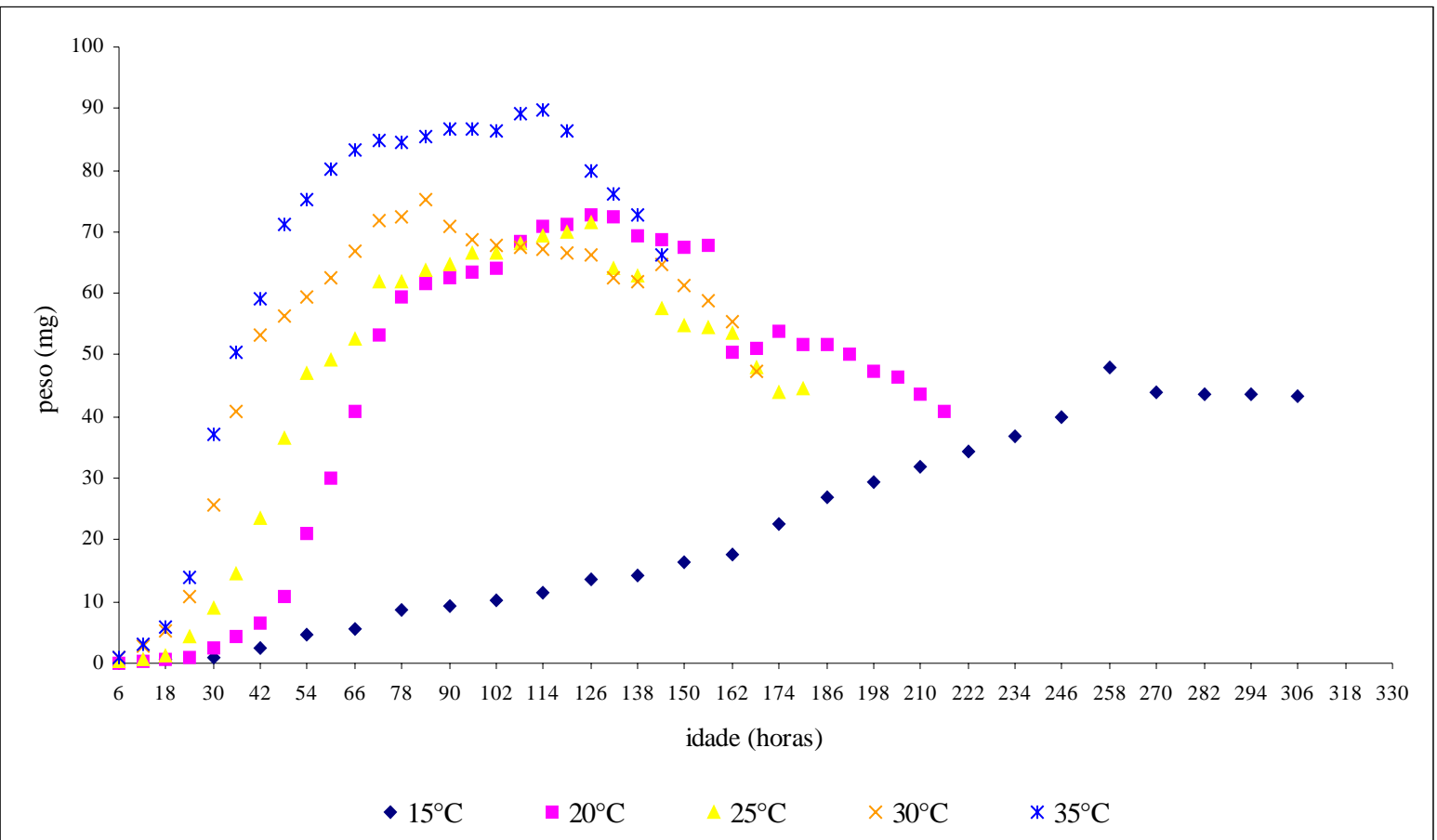
\* Nenhum imaturo eclodiu nesta temperatura.

Da eclosão até a pupariação, o ganho e a perda de massa corpórea dos estádios larvais de *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* e o comprimento do corpo correram paralelamente, aumentando durante as fases de alimentação e diminuindo na pós-alimentação da larva, onde ocorre também leve desidratação e retração de tecidos que marca o início do estágio de pré-pupa representada nos extremos finais de cada linha (Figuras 51-54).

**Figura 51:** Variação média de ganho e perda de massa (mg) para os estádios larvais de *Hemiliucilia segmentaria* expostos às diferentes condições de temperatura.

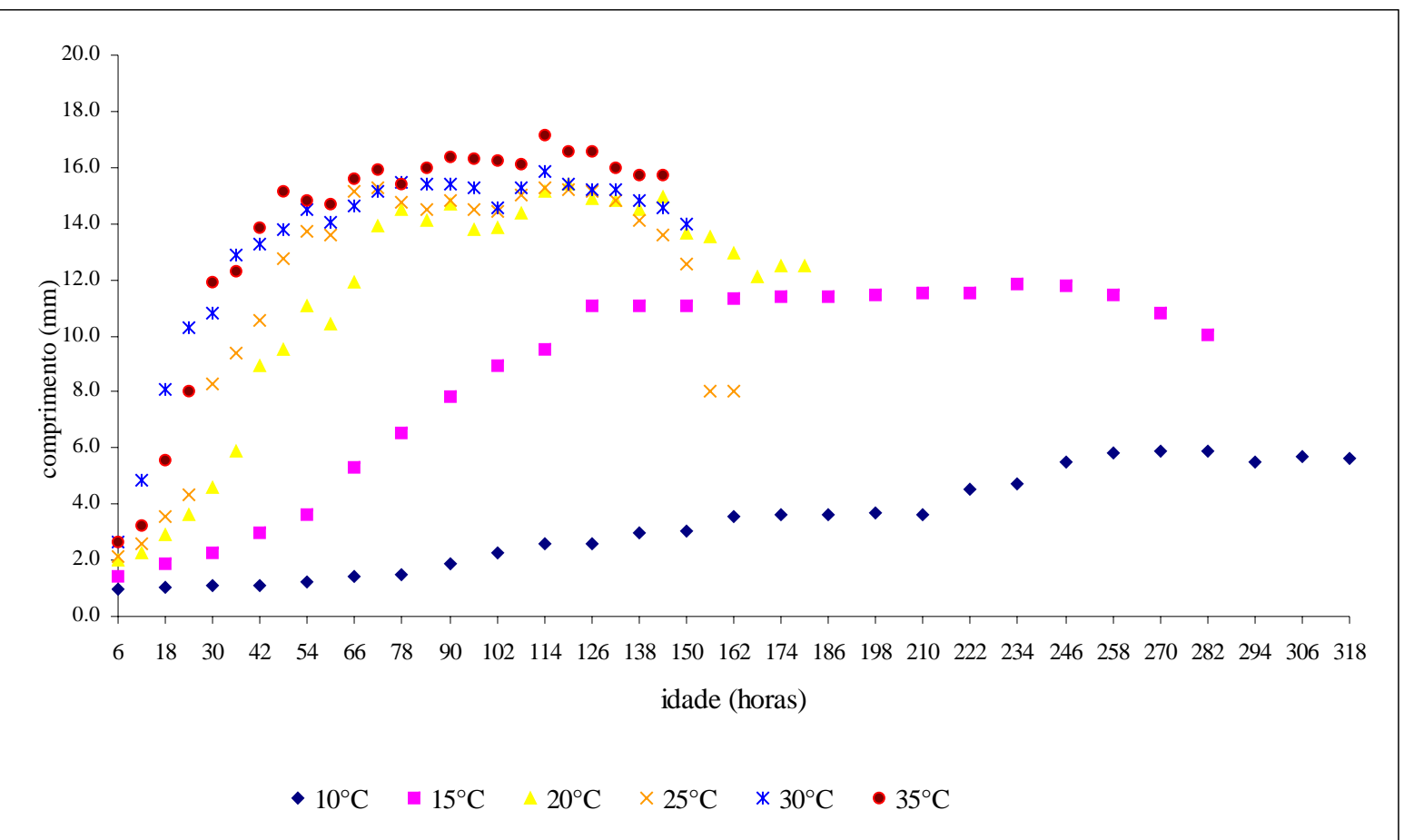


**Figura 52:** Variação média de ganho e perda de massa (mg) para os estádios larvais de *Hemiliucilia semidiaphana* expostos às diferentes condições de temperatura.

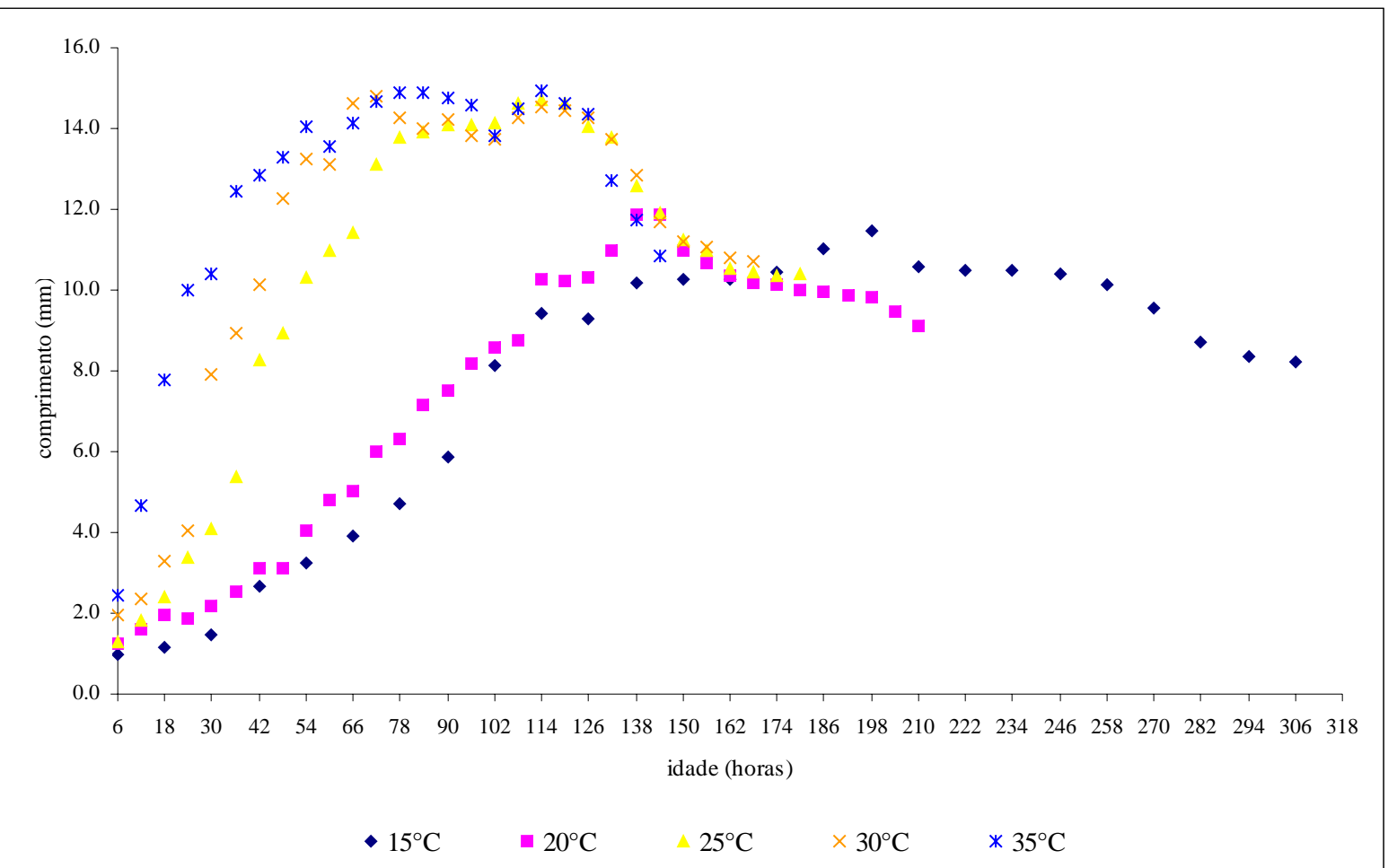




**Figura 53:** Variação média do comprimento (mm) dos estádios larvais de *Hemilucilia segmentaria* expostos às diferentes condições de temperatura.



**Figura 54:** Variação média do comprimento (cm) dos estádios larvais de *Hemilucilia semidiaphana* em diferentes condições de temperatura.



### ***Exigências térmicas – Modelo de graus-horas ou horas-acumuladas (ADH)***

Os valores da temperatura basal (tb), da constante térmica (K) e as equações da velocidade de desenvolvimento para cada estágio imaturo e tempo total de desenvolvimento, para as duas espécies, encontram-se nas Tabelas 4 e 5. As representações gráficas da velocidade e tempo de desenvolvimento em função da temperatura são descritas nas Figuras 55 e 56. Todos os cálculos efetuados para as duas espécies foram feitos levando em conta somente o limite térmico onde houve desenvolvimento completo dos espécimes (15-35°), ou seja, onde foi observada a emergência de adultos.

**Tabela 4:** Temperatura basal (tb), constante térmica (K) e equações da velocidade de desenvolvimento para cada estágio imaturo e tempo total de desenvolvimento de *Hemilucilia segmentaria* expostos às temperaturas de 15-35°C.

<b>Parâmetros/ Estádios</b>	<b>Tb (°C)</b>	<b>K (graus-horas)</b>	<b>Equação de desenvolvimento</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>χ<sup>2</sup></b>
<b>Ovo</b>	-38,68	808,50	1/D=0,047838+0,001237 x	0,9366	0,1270 ns
<b>1º larval</b>	4,01	354,93	1/D=-0,011310+0,002817 x	0,9538	3,0160 ns
<b>2º larval</b>	2,42	545,45	1/D=-0,004444+0,001833 x	0,9680	0,7835 ns
<b>3º larval</b>	-15,42	4233,96	1/D=0,003643+0,000236 x	0,8436	9,9294 **
<b>Pré-pupa</b>	-7,37	915,25	1/D=0,008056+0,001093 x	0,7332	5,4643 ns
<b>Pupa</b>	-35,85	8075,56	1/D=0,004439+0,000124 x	0,7667	2,2890 ns
<b>Total</b>	-17,37	13624,78	1/D=0,001275+0,000073 x	0,9388	4,4905 ns

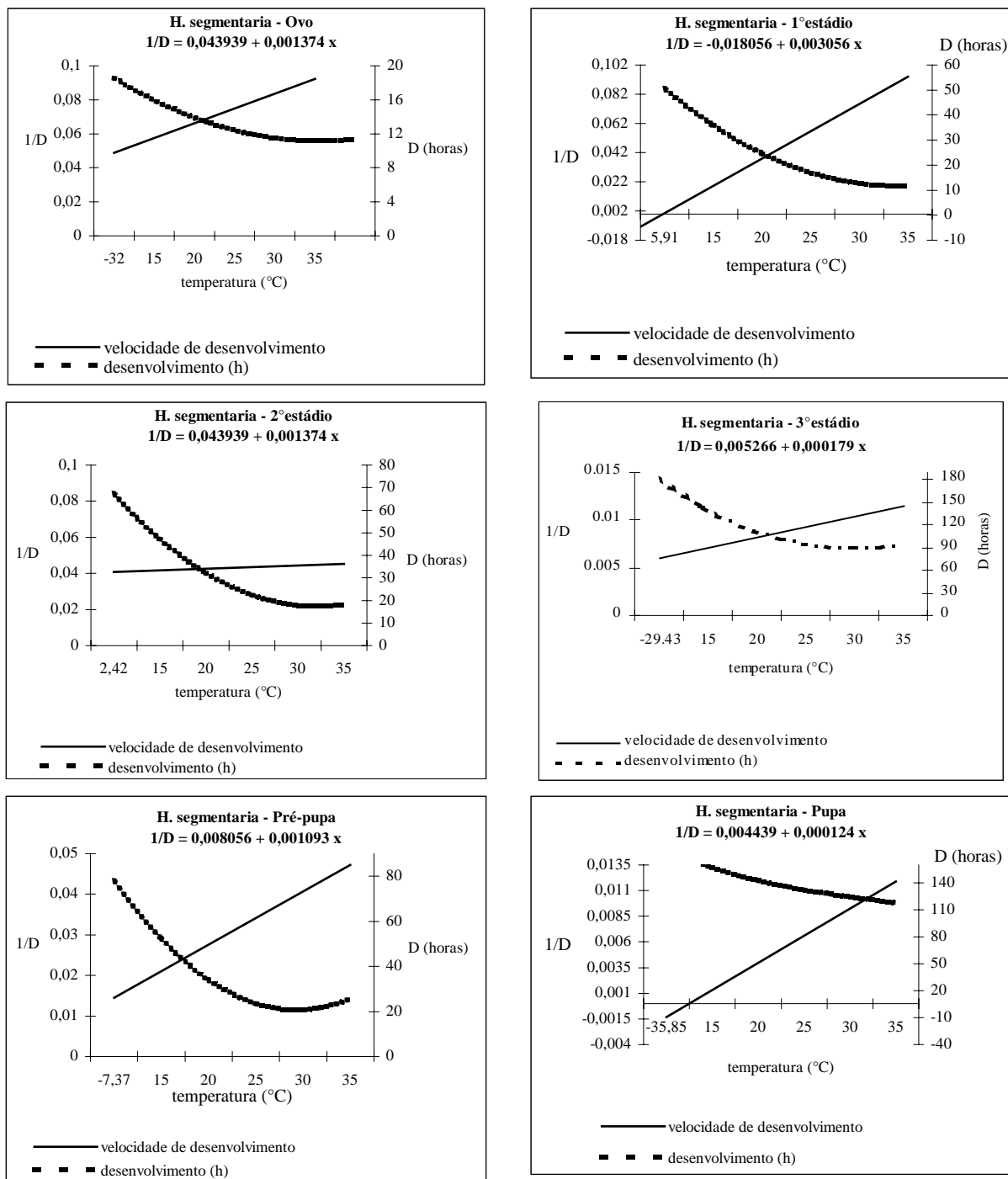
Onde: ns= não significativo ao nível de 5% e \*\*= significativo ao nível de 5%

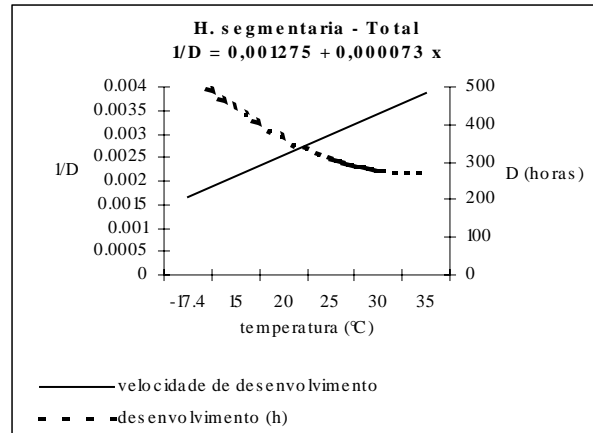
**Tabela 5:** Temperatura basal (tb), constante térmica (K) e equações da velocidade de desenvolvimento para cada estágio imaturo e tempo total de desenvolvimento de *Hemilucilia semidiaphana* exposto às temperaturas de 15-35°C.

Parâmetros/ Estádios	Tb (°C)	K (graus-horas)	Equação de desenvolvimento	R <sup>2</sup>	χ <sup>2</sup>
<b>Ovo</b>	-87,24	2189,76	1/D=0,039838+0,000457 x	0,9067	0,0437 ns
<b>1° larval</b>	4,02	352,94	1/D=-0,011389+0,002833 x	0,9316	0,6085 ns
<b>2° larval</b>	-4,82	964,29	1/D=0,005000+0,001037 x	0,9245	1,1605 ns
<b>3° larval</b>	-11,65	4076,64	1/D=0,002857+0,000245 x	0,8884	4,8607 ns
<b>Pré-pupa</b>	0,38	646,15	1/D=-0,000595+0,001548 x	0,9343	0,8294 ns
<b>Pupa</b>	-38,18	14296,32	1/D=0,002671+0,000070 x	0,9836	0,2262 ns
<b>Total</b>	-21,89	20254,62	1/D=0,001081+0,000049 x	0,9953	0,3536 ns

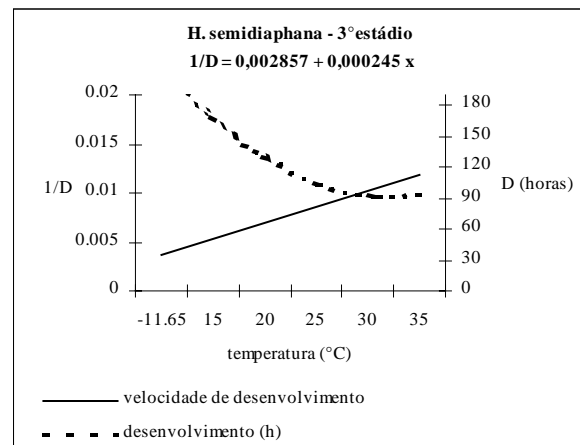
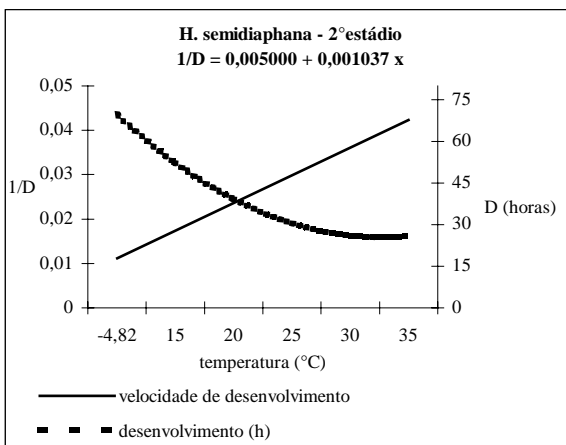
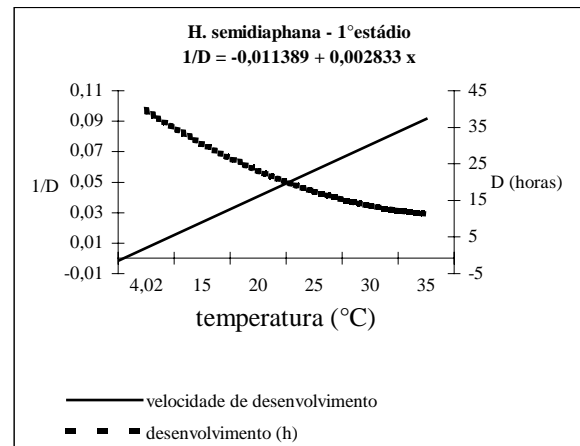
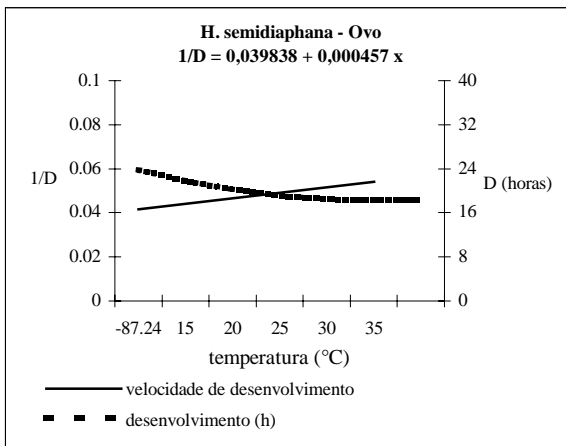
Onde: ns= não significativo ao nível de 5% e \*\*= significativo ao nível de 5%

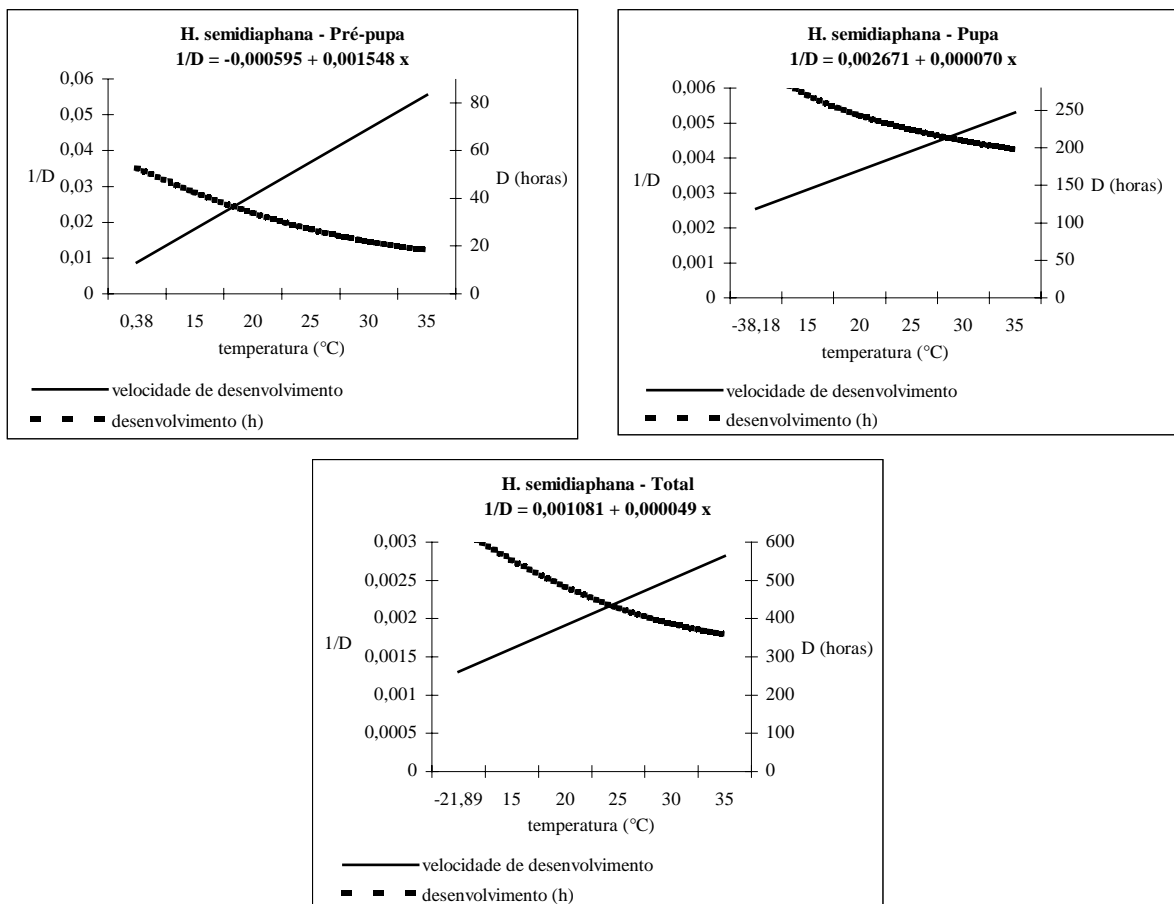
**Figura 55:** Velocidade e tempo de desenvolvimento, em função da temperatura, para cada estágio imaturo e tempo total de desenvolvimento de *Hemilucilia segmentaria*, exposta às temperaturas de 15-35°C.





**Figura 56:** Velocidade e tempo de desenvolvimento, em função da temperatura, para cada estágio imaturo e tempo total de desenvolvimento de *Hemilucilia semidiaphana*, exposta às temperaturas de 15-35°C.

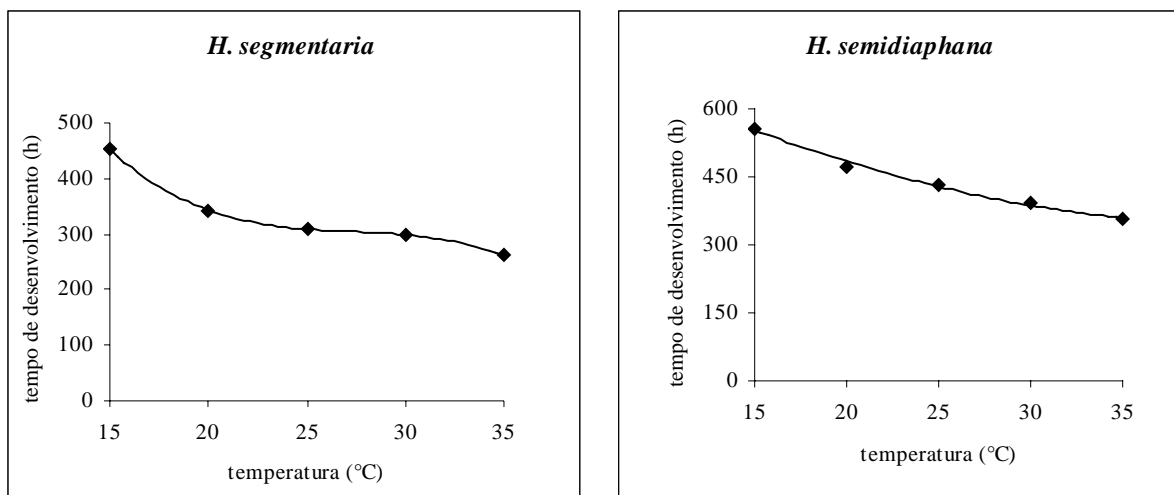




### ***Relação temperatura vs desenvolvimento vs variáveis biológicas***

Além do método de ADH, o desenvolvimento vs temperatura foi estudado por modelo de regressão do tipo polinomial. Assim, considerando o tempo total de desenvolvimento para as duas espécies, para *H. segmentaria* foi obtida a equação  $\hat{y} = 1745,3 - 155,15x + 5,6243x^2 - 0,0687x^3$  ( $R^2=0,9999$ ;  $F= 2923,8165$ ;  $p=0,0160$ ) e para *H. semidiaphana* obteve-se a equação  $\hat{y} = 847,5429 - 23,8429x + 0,2829x^2$  ( $R^2=0,9928$ ;  $F= 138,7091$ ;  $p=0,0058$ ) (Figura 57), levando em conta o modelo que apresentava o maior  $R^2$ .

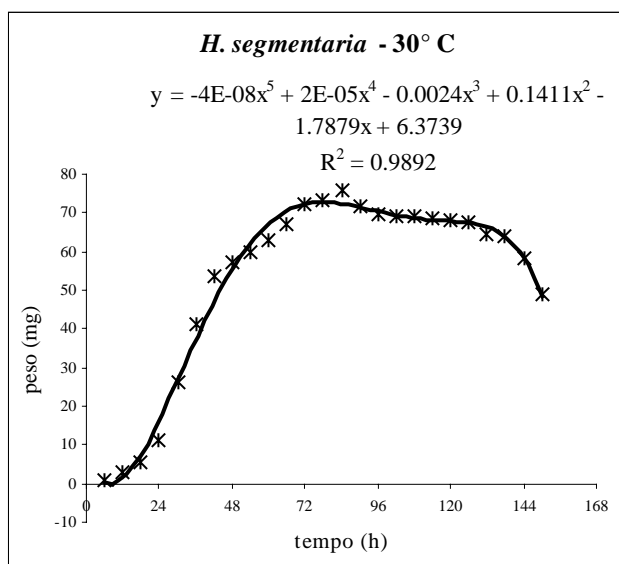
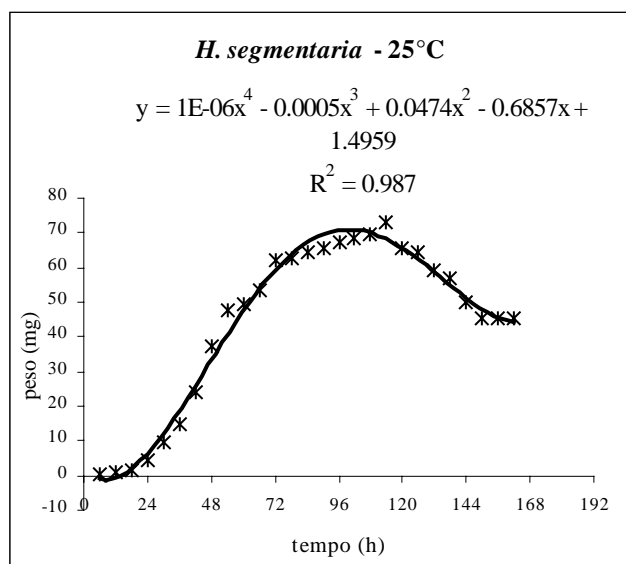
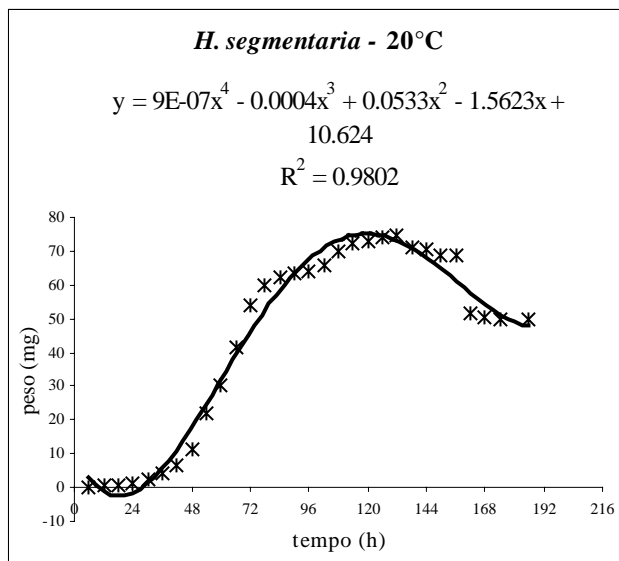
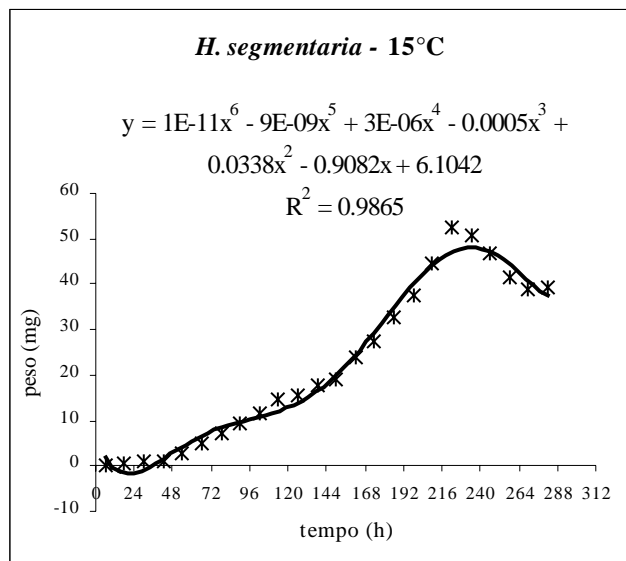
**Figura 57:** Modelo não-linear de desenvolvimento para as espécies *Hemilucilia segmentaria* e *Hemilucilia semidiaphana* criadas em diferentes temperaturas.

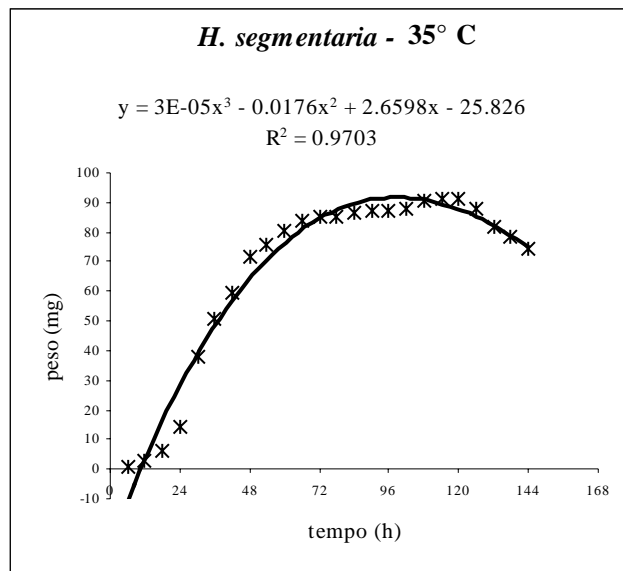


O comprimento e o peso (obtidos somente nos estádios larvais) também foram utilizados na tentativa de estimar a idade de imaturos e inferir o IPM. As variáveis obtidas foram ajustadas (Tabelas 10-29 no item *Anexos*) para interpretar a relação destas com o tempo total de desenvolvimento, para cada parâmetro, em diferentes temperaturas. Em todos os casos, modelos de regressão não-lineares foram os que melhor se ajustaram para as situações estudadas (Figuras 58-61).

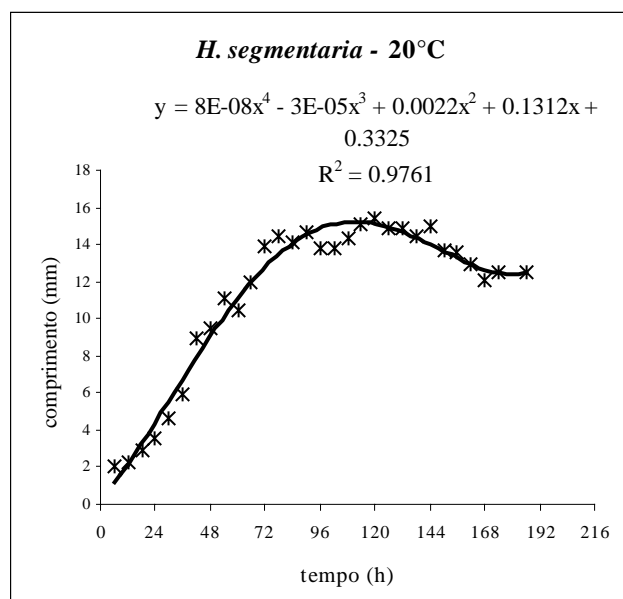
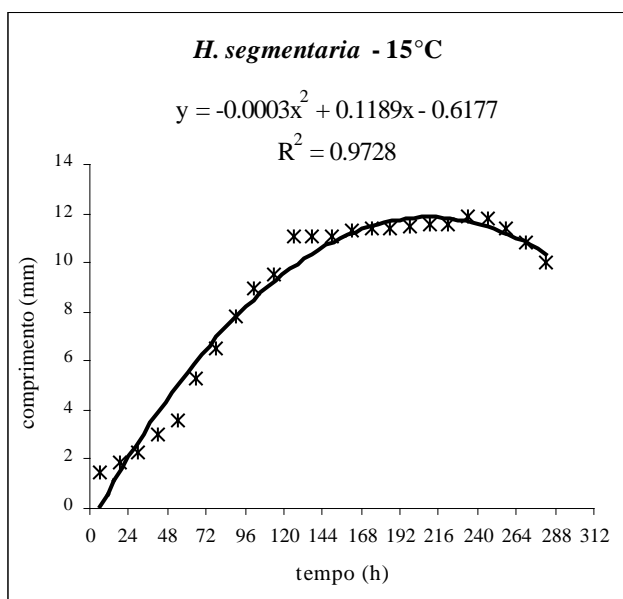


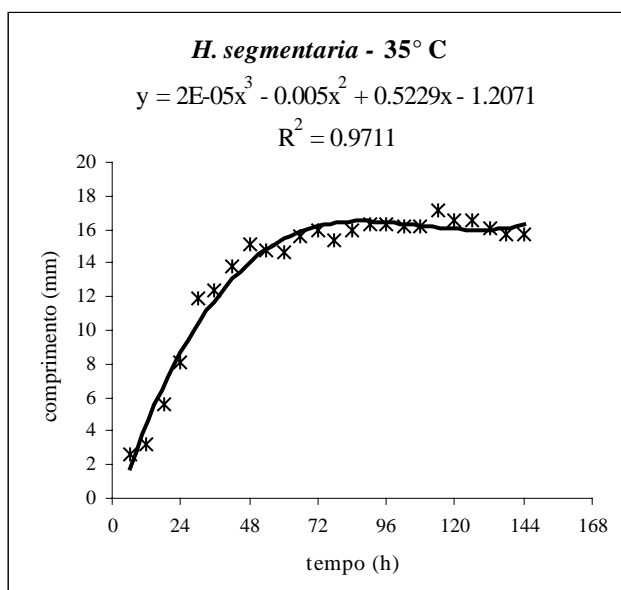
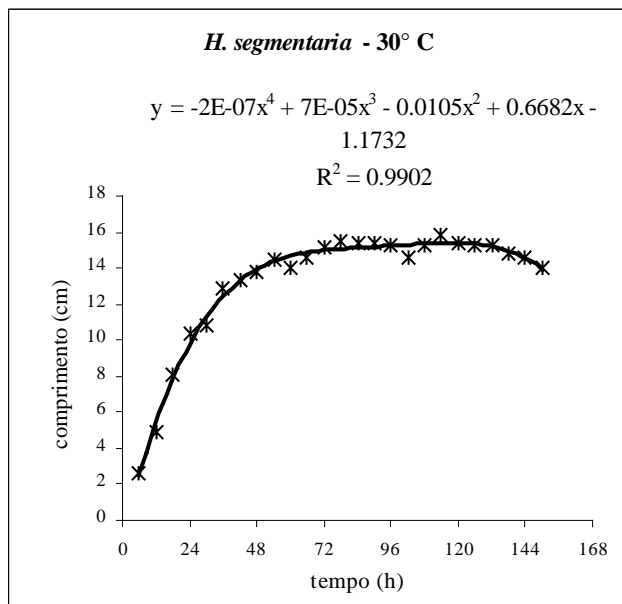
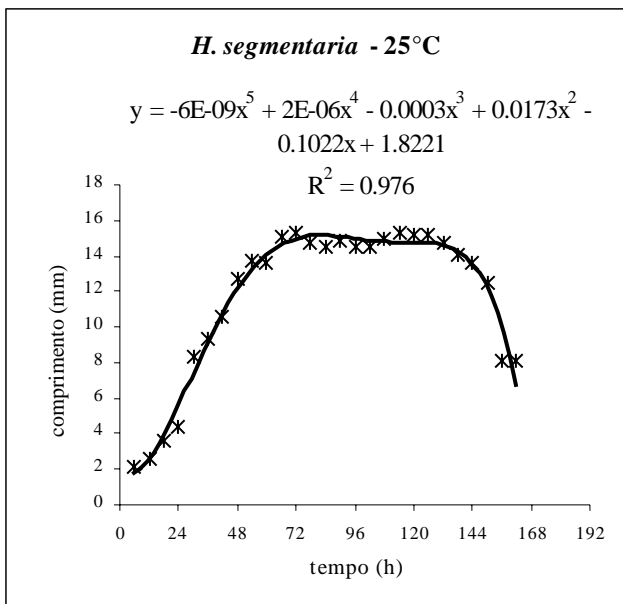
**Figura 58:** Modelo não-linear de desenvolvimento para a espécie *Hemilucilia segmentaria*, criada em diferentes temperaturas, com relação a variável peso.



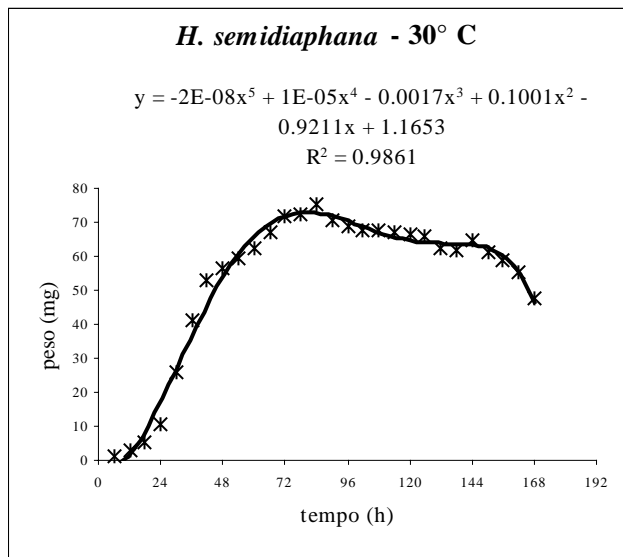
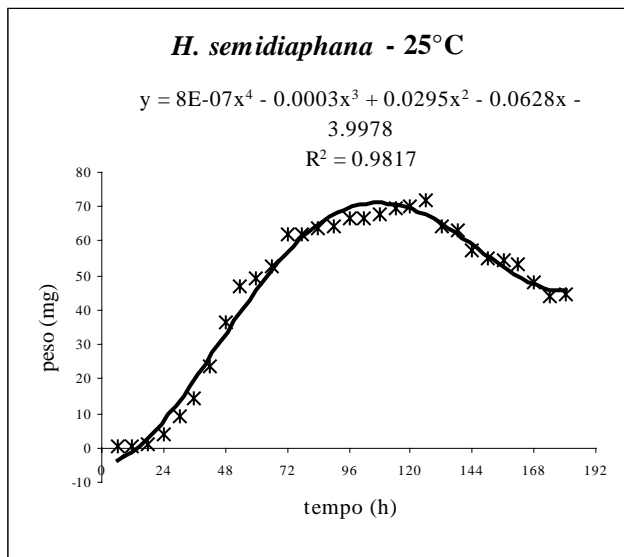
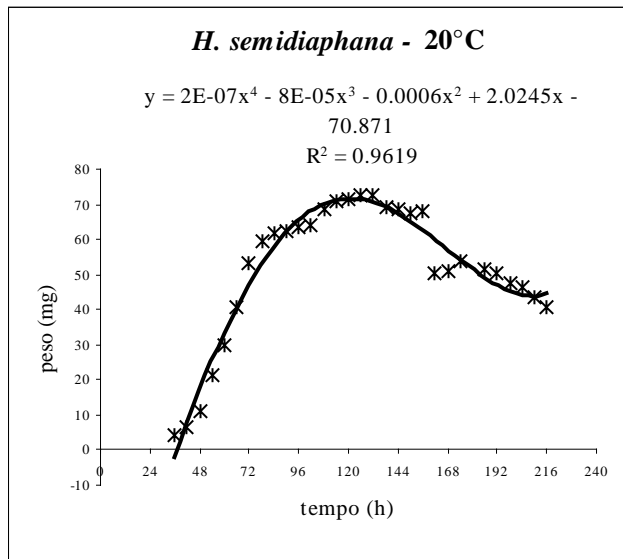
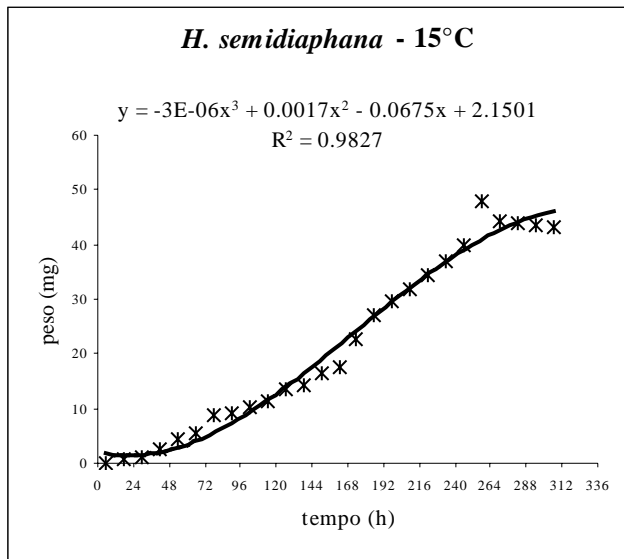


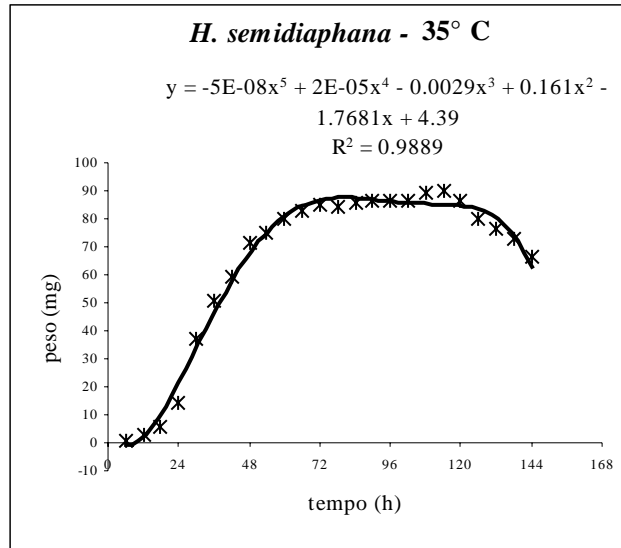
**Figura 59:** Modelo não-linear de desenvolvimento para a espécie *Hemilucilia segmentaria*, criada em diferentes temperaturas, com relação a variável comprimento.



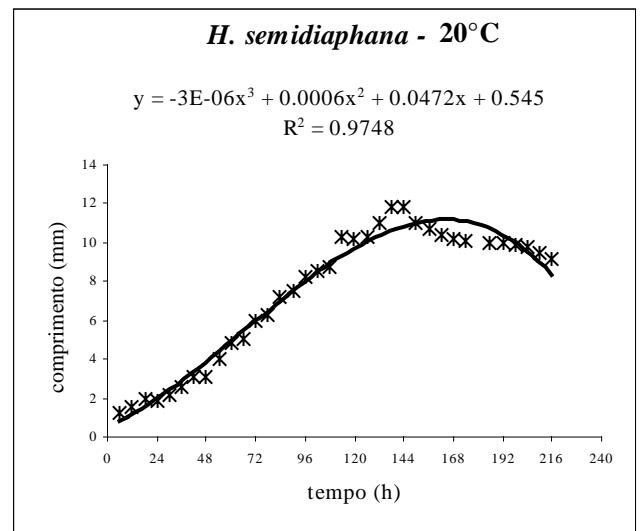
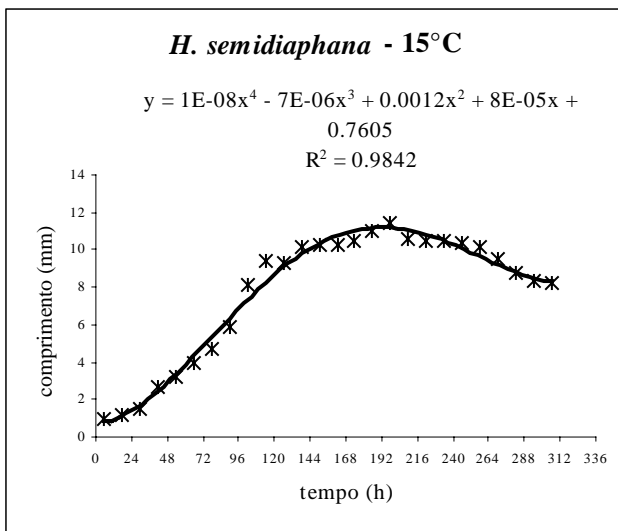


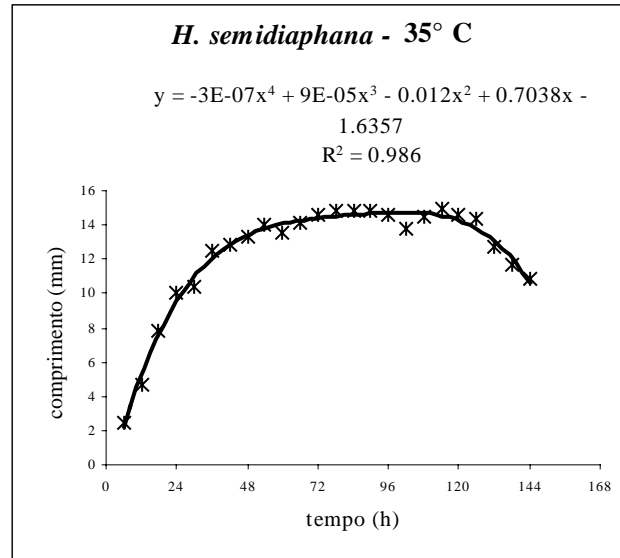
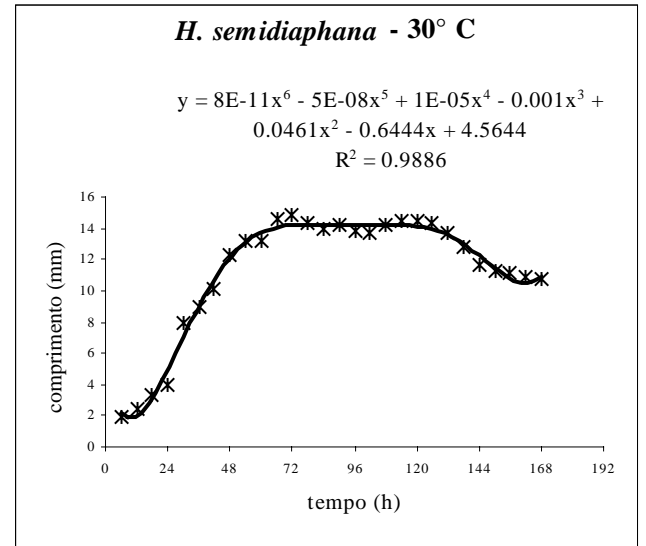
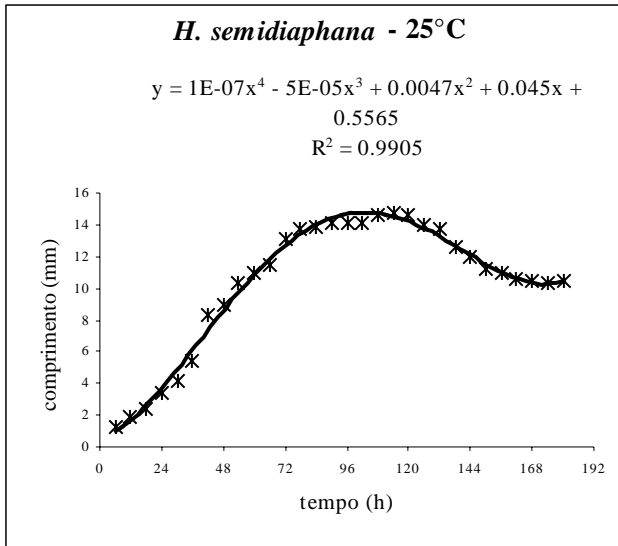
**Figura 60:** Modelo não-linear de desenvolvimento para a espécie *Hemilucilia semidiaphana*, criada em diferentes temperaturas, com relação a variável peso.





**Figura 61:** Modelo não-linear de desenvolvimento para a espécie *Hemilucilia semidiaphana*, criada em diferentes temperaturas, com relação a variável comprimento.





## 6.4 – DISCUSSÃO

Com relação ao desenvolvimento de imaturos, de modo geral, é de fundamental importância considerar os fatores bióticos (metabolismo) e os abióticos (temperatura, umidade, fotoperíodo, recurso alimentar, presença de determinadas substâncias e o nível de agregação das larvas presentes), já que estes podem se relacionar diretamente afetando a determinação do IPM, especialmente quando este é baseado na taxa de desenvolvimento

larval. As idades das larvas determinadas em laboratório podem ser erroneamente calculadas quando estas se alimentam de um cadáver que contenha drogas, por exemplo (Greenberg & Kunich, 2002).

Neste estudo, observou-se que a temperatura na qual os indivíduos estavam submetidos foi um fator determinante no metabolismo e no tempo de desenvolvimento de imaturos de *H. segmentaria* e *H. semidiaphana*, e a correlação inversamente proporcional entre a temperatura e a velocidade de desenvolvimento corrobora a teoria de que animais poeilotérmicos completam seu desenvolvimento mais rapidamente em ambientes mais quentes do que nos mais frios (Andrewartha & Birch, 1954). Com relação aos limites térmicos para o desenvolvimento das duas espécies, *H. segmentaria* mostrou-se um pouco mais tolerante a baixas temperaturas.

O modelo de horas-acumuladas ou ADH trabalha com a hipótese de linearização do desenvolvimento, ou seja, estima que a taxa de desenvolvimento do inseto e a temperatura obedeçam a uma relação linear. De um modo geral, verificou-se que os coeficientes de determinação foram altos ( $R^2 > 0,90$ ) para todas as fases imaturas das duas espécies, demonstrando que a duração do desenvolvimento vs temperatura pode ser explicado pelas equações de regressão obtidas, exceto com relação ao terceiro estágio larval que não apresentou um coeficiente de correlação tão alto.

Uma desvantagem observada no método da hipérbole é que a relação tempo de desenvolvimento vs temperatura tende a tornar-se não-linear a medida que se aproxima dos limites máximos e mínimos de desenvolvimento do inseto. Assim, quando é possível, o método de análise não-linear ou polinomial seria o mais adequado para a inferência da idade de insetos por apresentar um coeficiente de correlação maior quando comparado à

análise linear, permitindo um melhor ajuste dos dados analisados, o que denota maior confiabilidade nos resultados obtidos.

Mesmo assim, o grande valor do ADH está na possibilidade de avaliar a idade de um inseto, conhecendo a temperatura na qual o organismo se desenvolveu, associada a cada estágio de desenvolvimento do mesmo, sem precisar que este complete todo o seu crescimento. Isto é válido, principalmente, quando o entomologista forense só tem acesso a amostras onde o desenvolvimento foi interrompido, por exemplo, imaturos que foram recolhidos de um corpo e colocadas em algum tipo de fixador.

Já o modelo de regressão polinomial, consiste em determinar a melhor equação que descreve o desenvolvimento tendo como função a temperatura. Neste método, cada etapa sucessiva do tempo de desenvolvimento (representada em cada nível da curva termal) é adicionada até que o tempo de desenvolvimento total (100%) seja obtido, representando graficamente a curva de temperatura. Este método também permite a análise de outras variáveis como, por exemplo, peso e comprimento, em função do desenvolvimento.

Teoricamente, este é o melhor método de representação do desenvolvimento, observado pelos altos valores encontrados nos coeficientes de correlação ( $R^2 > 0,96$ ) para ambas as espécies em todas as temperaturas, tanto com relação ao desenvolvimento vs temperatura como com relação as variáveis peso e comprimento em função do desenvolvimento, indicando que este método pode ser usado com segurança para uma estimativa precisa da idade de imaturos, se a temperatura puder ser também obtida com precisão. O único contraponto, é a obrigatoriedade de observação do ciclo completo do inseto, ou seja, além do entomologista forense ter que obter amostras vivas, estas têm que ser mantidas em laboratório até atingirem o desenvolvimento total para que os parâmetros que se almejam estimar possam ser obtidos.



## 7 — CONCLUSÕES GERAIS

1. Por meio de estudos morfológicos tradicionais, foi possível estabelecer parâmetros para o reconhecimento e a diferenciação das espécies *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) e *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani) quando estas se encontram em suas fases imaturas. As diferenças observadas se dão principalmente quanto à distribuição dos tubérculos na região posterior do último segmento, quanto à estrutura do esqueleto céfalo-faríngeo e quanto à conformação do espiráculo posterior.
2. Apesar das características aqui apontadas poderem auxiliar na identificação destas duas espécies, recomenda-se a associação destas com demais informações que puderem ser obtidas como distribuição geográfica, comportamento e hábitos alimentares, já que algumas das características apontadas não divergem muito das observadas em outras espécies da família Calliphoridae, especialmente dos gêneros *Lucilia*, *Paralucilia* e mesmo de outros membros do gênero *Hemilucilia* que não são encontradas na região de estudo, mas que eventualmente possam ser introduzidos no Brasil.
3. Como pode ser visto aqui, marcadores moleculares do tipo PCR-RFLP foram muito úteis na identificação de *H. segmentaria* e *H. semidiaphana*, distinguindo estas duas espécies de califorídeos relacionadas proximamente que convivem na mesma área geográfica, e que não são facilmente distinguidas por critérios morfológicos durante os primeiros estádios imaturos.

4. Os padrões de restrição diagnósticos foram monomórficos em todas as amostras analisadas, tanto para a região CO1 quanto para a região A+T do DNA mitocondrial, revelando a confiabilidade do método. Mesmo assim, amplificações da região A+T podem representar uma estratégia de maior valia para as ciências forenses por melhor recuperar, por meio de PCR, amostras inadequadamente preservadas.
5. A temperatura influenciou a duração dos estádios imaturos de *H. segmentaria* e *H. semidiaphana*, ocorrendo um aumento na velocidade total de desenvolvimento sob condições térmicas mais elevadas. O 3º estágio larval e o de pupa foram os que mais sofreram influência dentre as faixas térmicas estudadas (15-35°C).
6. As temperaturas basais e as constantes térmicas variaram com o estágio de desenvolvimento do inseto, oscilando entre -38,68 a 4,01°C e de 354,93 a 13624,78 GD para *H. segmentaria*, e entre -87,24 a 4,02°C e de 352,94 a 20254,62 GD para *H. semidiaphana*, respectivamente.
7. Os modelos propostos para o estudo de desenvolvimento e estimativa da idade de imaturos, o de ADH e o polinomial, para as espécies *H. segmentaria* e *H. semidiaphana* devem levar em consideração o estado atual da amostra, se viva ou fixada. Contudo, quando se tem acesso a amostras vivas o método não-linear ou polinomial é o mais adequado e confiável, apresentando um melhor ajuste em relação ao comportamento destas duas espécies.

## 8 — BIBLIOGRAFIA GERAL

- Amendt, J.; Krettek, R. & Zehner, R. 2004. Forensic entomology. *Naturwissenschaften*, 91: 51-65.
- Amorim, J.A. & Ribeiro, O.B. 2001. Distinction among the puparia of three blowfly species (Diptera: Calliphoridae) frequently found on unburied corpses. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96: 781-784.
- Amoundi, M.A., Diab, F.M. & Abou-Fannah, S.S.M. 1994. Development rate and mortality of immature *Parasarcophaga (Liopygia) ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) at constant laboratory temperatures. *J. Med. Entomol.*, 31: 168-170.
- Anderson, G.S. 1999. Minimum and maximum development rates of some forensically important Calliphoridae (Diptera). *J. For. Sci.*, 45: 824-832.
- Andrewartha, H.G. & Birch, L.C. 1954. *The distribution and abundance of animals*. Chicago e London, Univ. Chigado Press. 782 p.
- Benecke, M. 1998. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of necrophagous insects (Diptera, Coleoptera) in criminal forensic studies: validation and use in practice. *For. Sci. Int.* 98: 157-168.
- Benecke, M. 2001. A brief history of forensic entomology. *For. Sci. Int.*, 120: 2-14.
- Benecke, M. & Wells, J. 2000. DNA techniques for forensic entomology. In: Byrd, J.H. & Castner, J.L. (eds). *Forensic entomology*. CRC Press, Washington, DC. pp.341-352.
- Benecke, M. & Lessig, R. 2001. Child neglect and forensic entomology. *For. Sci. Int.*, 120: 155-159.
- Benecke, M. & Barksdale, L. 2003. Distinction of bloodstain patterns from fly artifacts. *For. Sci. Int.* 137: 152-159.
- Beyer, J.C., Enos, W.F. & Stajic, M. 1980. Drug identification through analysis of maggots. *J. For. Sci.*, 25: 411-412.
- Blomquist, G.J. & Dillwith, J.W. 1985. Cuticular lipids. In: Kerkut, G.A.; Gilbert, L.I. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Pergamon Press, Oxford. pp.117-154.
- Bornemissza, G.F. 1957. An analysis of arthropod succession in carrion and the effect of its decomposition on the soil fauna. *J. Aust. Zool.*, 5: 1-12.
- Brown, W.V.; Morton, R. & Spradbery, J.P. 1992. Cuticular hydrocarbons of the Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana* Villeneuve (Diptera, Calliphoridae) – chemical characterization and quantification by age and sex. *Comp. Biochem. Phys. B.*, 101: 665-671.
- Brown, W.V., Morton, R., Lacey, M.J., Spradbery, J.P. & Mahon, R.J. 1998. Identification of the geographical source of adults of the Old World screw-worm fly, *Chrysomya bezziana* Villeneuve (Diptera: Calliphoridae), by multivariate analysis of cuticular hydrocarbons. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119: 391-399.
- Brown, R.E., Hawkes, R.I., Parker, M.A. & Byrd, J.H. 2000. Entomological alteration of bloodstain evidence. In: Byrd, J.H. & Castner, J.L. (eds). *Forensic entomology*. CRC Press, Washington, DC. pp.353-378.

- Byrd, J.H. & Butler, J.F. 1998. Effects of temperature on *Sarcophaga haemorrhoidalis* (Diptera: Sarcophagidae) development. *J. Med. Entomol.*, 35: 694-698.
- Byrne, A.L., Camann, M.A., Cyr, T.L., Catts, E.P. & Espelie, K.E. 1995. Forensic implications of biochemical differences among geographic populations of the black blow fly, *Phormia regina* (Meigen). *J. For. Sci.*, 40: 372-377.
- Carvalho, L.M.L. 1996. *Sucessão e ecologia de populações de insetos associados à decomposição de carcaças de suínos expostas em ambiente natural de mata mesófila semidecídua, Campinas-SP*. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. Dissertação de Mestrado. 75p.
- Carvalho, L.M.L. & Linhares, A.X. 2001. Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest area in Southeastern Brazil. *J. For. Sci.*, 46: 604-608.
- Carvalho, L.M.L., Thyssen, P.J., Linhares, A.X. & Palhares, F.B. 2000. A checklist of arthropods associated with carrion and human corpses in southeastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95: 135-138.
- Carvalho, L.M.L., Linhares, A.X. & Trigo, J.R. 2001. Determination of drug levels and effect of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil. *For. Sci. Int.*, 120: 140-144.
- Carvalho, L.M.L.; Thyssen, P.J.; Goff, M.L. & Linhares, A.X. 2004. Observations on the succession patterns of necrophagous insects onto a pig carcass in an urban area of Southeastern Brazil. *Aggrawal's Int. J. For. Med. Toxicol.*, 5: 33-39.
- Castner, J.L. 2000. General entomology and arthropod biology. In: Byrd, J.H. & Castner, J.L. (eds). *Forensic entomology*. CRC Press, Washington, DC. pp.17-42.
- Catts, E.P. & Haskell, N.H. 1990. *Entomology and death: a procedural guide*, Joyce's Print Shop, USA. 182p.
- Catts, E.P. & Goff, M.L. 1992. Forensic entomology in criminal investigations. *Annu. Rev. Entomol.*, 37: 253-272.
- Caterino, M.S., Cho, S. & Sperling, F.A.H. 2000. The current state of insect molecular systematics. *Annu. Rev. Entomol.*, 45: 1-54.
- Daly, H.V., Doyen, J.T. & Ehrlich, P.R. 1978. *Introduction to insect biology and diversity*. McGraw-Hill, USA. pp.414-439.
- Davies, L. & Ratcliffe, G.G. 1994. Development rates of some pre-adult stages in blowflies with reference to low temperatures. *Med. Vet. Entomol.*, 8: 245-254.
- Dear, J.P. 1985. A revision of the New World Chrysomyini (Diptera) (Calliphoridae). *Rev. Bras. Zool.*, 3: 109-169.
- Duenas, J.C.R., Panzetta-Dutari, G.M., Blanco, A. & Gardenal, C.N. 2002. Restriction fragment-length polymorphism of the mtDNA A+T-rich region as a genetic marker in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 95: 352-358.
- Ellison, J.R. & Hampton, E.N. 1982. Age determination using the apodeme structure in adult screwworm flies (*Cochliomyia hominivorax*). *J. Insect Physiol.*, 28: 731-736.
- Erzinçlioglu, Y.Z. 1983. The application of entomology to forensic medicine. *Med. Sci. Law*, 23: 57-63.

- Erzinçlioglu, Y.Z. 1989. The value of chorionic structure and size in the diagnosis of blowfly eggs. *Med. Vet. Entomol.*, 3: 281-285.
- Ferrar, P. 1987. *A guide to the breeding habits and immature stages of Diptera Cyclorrhapha*. Copenhagen, Science Press. 907p.
- Freire, O. 1914. Algumas notas para o estudo da fauna cadavérica da Bahia. *Gaz. Med. Bahia*, 46: 110-125.
- Freire, O. 1923. Fauna cadavérica brasileira. *Rev. Med.*, 3: 15-40.
- Goff, M.L. & Lord, W.D. 1994. Entomotoxicology: a new area for forensic investigation. *Am. J. For. Med. Pathol.*, 15: 51-57.
- Goff, M.L. & Win, B.H. 1997. Estimation of postmortem interval based on colony development time for *Anoplolepis longipes* (Hymenoptera: Formicidae). *J. For. Sci.*, 42: 1176-1179.
- Goff, M.L., Omori, A.I. & Gunatilake, K. 1988. Estimation of postmortem interval by arthropod succession: three case studies from the Hawaiian Islands (U.S.A.). *Am. J. For. Med. Pathol.*, 9: 220-225.
- Goff, M.L., Omori, A. I. & Goodbrod, J.R. 1989. Effect of cocaine in tissue on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae). *J. Med. Entomol.*, 26: 91-93.
- Goff, M.L., Charbonneau, S. & Sullivan, W. 1991. Presence of fecal material in diapers as a potential source of error in estimations of postmortem interval using arthropod development rates. *J. For. Sci.*, 36: 1603-1606.
- Goodbrod, J.R. & Goff, M.L. 1990. Effects of larval population density on rates of development and interactions between two species of *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the laboratory culture. *J. Med. Entomol.*, 27: 338-343.
- Grassberger, M. & Reiter, C. 2001. Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen-diagram. *For. Sci. Int.*, 120: 32-36.
- Grassberger, M. & Reiter, C. 2002a. Effect of temperature on development of the forensically important holarctic blow fly *Protophormia terranova* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). *For. Sci. Int.*, 128: 177-182.
- Grassberger, M. & Reiter, C. 2002b. Effect of temperature on development of *Liopygia* (= *Sarcophaga*) *argyrostoma* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Sarcophagidae) and its forensic implications. *J. For. Sci.*, 47: 1332-1336.
- Greenberg, B. 1990. Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and a muscid (Diptera). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 83: 1210-1214.
- Greenberg, B. 1991. Flies as forensic indicator. *J. Med. Entomol.*, 28: 565-577.
- Greenberg, B. & Szyska, M. 1984. Immature stages and biology of fifteen species of Peruvian Calliphoridae (Diptera). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 77: 488-517.
- Greenberg, B. & Kunich, J.C. 2002. *Entomology and the law: flies as forensic indicators*. Cambridge, University Press, USA. 356p.
- Guimarães, J.H., Prado, A.P. & Linhares, A.X. 1978. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Rev. Bras. Ent.*, 22: 53-60.

- Guimarães, J.H.; Prado, A.P.; Buralli, G.M. 1979. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Rev. Bras. Ent.*, 23: 245-255.
- Haddad, M.L., Parra, J.R.P. & Moraes, R.C.B. 1999. *Métodos para estimar os limites térmicos inferior e superior de desenvolvimento de insetos*. Fealq, SP, Brasil. 29p.
- Hadley, N.F. 1985. *The adaptative role of lipids in biological systems*. Wiley-Interscience, New York.
- Hanski, I. 1987. Carrion fly community dynamics: patchiness, seasonality and coexistence. *Ecol. Entomol.*, 12: 257-266.
- Harvey, M.L., Dadour, I.R. & Gaudieri, S. 2003. Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in western Australia. *For. Sci. Intern.*, 131: 134-139.
- Hédouin, V., Bourel, B., Matin-Bouyer, L., Bécart, A., Tournel, G., Deveaux, M. & Gosset, D. 1999. Determination of drug levels in larvae of *Lucilia sericata* reared on rabbit carcasses containing morphine. *J. For. Sci.*, 44: 351-353.
- Howard, R.W. 1993. Cuticular hydrocarbons and chemical communication. In: Stanley-Samuelson, D.W. & Nelson, D.R. *Insect lipids: chemistry, biochemistry and biology*. University of Nebraska Press, Lincoln. pp. 179-226.
- Infante, M.E.V. & Azeredo-Espin, A.M.L. 1995. Genetic variability in mitochondrial DNA of screwworm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil, *Biochem. Genet.*, 33: 737-756.
- Jirón, L.F. & Cartín, V.M. 1981. Insect succession in the decomposition of a mammal in Costa Rica. *J. New York Entomol. Soc.*, 89: 158-165.
- Junqueira, A.C.M., Lessinger, A.C. & Azeredo-Espin, A.M.L. 2002. Methods for the recovery of mitochondrial DNA sequences from museum specimens of myiasis-causing flies. *Med. Vet. Entomol.*, 16: 39-45.
- Kamhawi, S.; Molyneux, D.H.; Killick-Kendrick, R. & Milligan, P. 1987. Two populations of *Phlebotomus ariasi* in the Cévennes focus of Leishmaniasis in the South of France revealed by analysis of cuticular hydrocarbons. *Med. Vet. Entomol.*, 1: 97-102.
- Kashyap, V.K. & Pillai, V.V. 1989. Efficacy of entomological method in estimation of postmortem interval: a comparative analysis. *Forensic Sci. Int.*, 40: 245-250.
- Keh, B. 1985. Scope and applications of forensic entomology. *Ann. Rev. Entomol.*, 30: 137-154.
- Kintz, P., Tracqui, B., Ludes, B., Waller, J., Boukhabza, A., Mangin, P., Lugnier, A.A. & Chaumont, A.J. 1990. Fly larvae and their relevance in forensic entomology. *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, 11: 63-65.
- Kruger, E.L. & Pappas, C.D. 1993. Geographic variation of cuticular hydrocarbons among fourteen populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, 30: 544-548.
- Leal, T.T.S.; Prado, A.P. & Antunes, A.J. 1982. Rearing the larvae of the blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. *Rev. Bras. Zool.*, 1: 41-44.

- Lefebvre, F. & Pasquerault, T. 2004. Temperature-dependent development of *Ophyra aenescens* (Wiedemann, 1830) and *Ophyra capensis* (Wiedemann, 1818) (Diptera, Muscidae). *For. Sci. Int.*, 139: 75-79.
- Lessinger A.C., Junqueira A.C.M., Conte, F.F. & Azeredo-Espin, A.M.L. (in press) Analysis of a conserved duplicated tRNA gene in the mitochondrial genome of blowflies. *Gene*
- Lessinger, A.C. & Azeredo-Espin, A.M.L. 2000. Evolution and structural organisation of the mitochondrial DNA control region of myiasis-causing flies. *Med. Vet. Entomol.*, 14: 71-80.
- Lincoln, R.J., Boxshall, G.A. & Clark, P.F. 1988. *A dictionary of ecology, evolution and systematics*. Cambridge Univ. Press, N. York. 298p.
- Litjens, P., Lessinger, A.C. & Azeredo-Espin, A.M.L. 2001. Characterization of the screwworm flies *Cochliomyia hominivorax* and *Cochliomyia macellaria* by PCR-RFLP of mitochondrial DNA. *Med. Vet. Entomol.*, 15: 183-188.
- Liu, D. & Greenberg, B. 1989. Immature stages of some flies of forensic importance. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 82: 80-93.
- Lockey, K.H. 1988. Lipides of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, 89: 595-645.
- Logan, J.A., Wollking, D.J., Hoyt, S.C. & Tanigoshi, L.K. 1976. An analytic model for description of temperature dependent rate phenomena in arthropods. *Environ. Entomol.*, 5: 1133-1140.
- Lord, W.D. & Stevenson, J.R. 1986. *Directory of forensic entomologists*. Washington DC, Am. Reg. Prof. Entomol., pp. 42.
- Lord, W.D. & Rodriguez, W.C. 1989. Forensic entomology: the use of insects in the investigation of homicide and untimely death. *Prosecutor*, 22: 41-48.
- Lunt, D.H., Zhang, D.X., Szymura, J.M. & Hewitt, G.M. 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol. Biol.*, 5: 153-165.
- Luz, M.A.M. 1998. *Tanatologia forense*. São José do Rio Preto, São Paulo. 123 p.
- Malgorn, Y. & Coquoz, R. 1999. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae of interest in forensic entomology. *For. Sci. Intern.*, 102: 111-119.
- Marchenko, M.I. 2001. Medicolegal relevance of cadaver entomofauna for the determination of time since death. *For. Sci. Int.*, 120: 89-109.
- Media Cybernetics. 1998. *Image-Pro Lite – the proven solution*. Version 4.0 for windows 95/net/98. Maryland, USA.
- Méglin, P. 1894. *Faune des cadavres. Application de L'entomologie a la Médecine Légale*. G. Masson Editeurs, Paris. 214 p.
- Monteiro-Filho, E.L.A. 1989. Determinação da idade cronológica de Calliphoridae (Diptera) através da deposição pós-emergencial de quitina. *Rev. Bras. Zool.*, 6: 241-244.
- Monteiro-Filho, E.L.A. & Penereiro, J.L. 1987. Estudo de decomposição e sucessão sobre uma carcaça animal numa área do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Biol.*, 47: 289-295.
- Moura, M.O., Carvalho, C.J.B. & Monteiro, E.L.A. 1997. A preliminary analysis of insects of medico-legal importance in Curitiba, State of Parana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 92: 269-274.

- Myskowiak, J.B. & Doums, C. 2002. Effects of refrigeration on the biometry and development of *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae) and its consequences in estimating post-mortem interval in forensic investigations. *For. Sci. Int.*, 125: 254-261.
- Nishida, K. 1984. Experimental studies on the estimation of postmortem intervals by means of fly larvae infesting human cadavers. *Jap. J. Legal Med.*, 38: 24-41.
- Norris, K.R. 1965. The bionomics of blow flies. *Ann. Rev. Entomol.*, 10: 47-68.
- Nuorteva, P. 1977. Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. In: Tedeshi, C.G., Eckert, W.G. & Tedeshi, L.G. (eds.). *Forensic medicine: a study in trauma and environmental hazards. Vol.II*. London. pp.1072-1095.
- Oliva, A., Ravioli, J., Trezza, F. & Navarri, C. 1995. Entomologia forense. *Prensa Méd. Argent.*, 82: 229-234.
- Otranto, D. & Stevens, J.R. 2002. Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. *Int. J. Parasitol.*, 32: 1345-1360.
- Payne, J.A. 1965. A summer carrion study of the baby pig *Sus scrofa* Linnaeus. *Ecol.*, 46: 592-602.
- Prado, A.P. & Guimarães, J.H. 1982. Estado atual da dispersão e distribuição do gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy na região neotropical (Diptera, Calliphoridae). *Rev. Bras. Ent.*, 26: 225-231.
- Prout, T. & McChesney, F. 1985. Competition among immatures and effects their adult fertility: population dynamics. *Am. Nat.*, 126: 521-558.
- Reed, H.B. 1958. A study of dog carcass communities in Tennessee, with special reference to the insects. *Am. Midl. Nat.*, 59: 213-245.
- Reis, S.F.; Teixeira, M.A.; Von Zuben, F.J.; Godoy, W.A.C.; Von Zuben, C.J. 1996. Theoretical dynamics of experimental populations of introduced and native blowflies (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.*, 33: 537-544.
- Repogle, J., Lord, W.D., Bodowle, B., Meinking, T.L. & Taplin, D. 1994. Identification of host DNA by amplified fragment length polymorphism (AMP-FLP) analysis of human crab louse excreta. *J. Med. Entomol.*, 31: 686-690.
- Ribeiro, N.M.D. 2003. *Comparação entre a decomposição e a sucessão entomológica em carcaças de suínos expostas em área de cerrado e mata ciliar, no Sudeste Brasileiro*. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. Dissertação de Mestrado. 64p.
- Rosa-Freitas, M.G.; Broomfield, G.; Priestman, A.; Milligan, P.J.M.; Momen, H.; Molyneux, D.H. 1992. Cuticular hydrocarbons, isoenzymes and behaviour of three populations of *Anopheles darlingi* from Brazil. *J. Am. Mosquito Contr. Assoc.*, 8: 357-366.
- S.A.S. Institute Incorporation. 1996. *S.A.S. User's Guide: Statistics. Version 6.12*. Cary, North Carolina, USA.
- Salvadori, J.R. & Parra, J.R.P. 1990. Efeito da temperatura na biologia e exigências térmicas de *Pseudaletia sequax* (Lep.: Noctuidae), em dieta artificial. *Pesq. Agropec. Bras.*, 25: 1693-1700.
- Sanders, C.J. 1975. Factors affecting adult emergence and mating behavior of the eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. Entomol.*, 107: 967-977.



- Schoolfield, R.M.; Sharpe, P.J.H. & Magnuson, C.E. 1981. Non-linear regression of biological temperature-dependent rate models based on absolute reaction-rate theory. *J. Theor. Biol.*, 88: 719-731.
- Séguy, E. 1925. Étude sur quelques Calliphorinés testacés rares ou peu connus. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat.*, 31: 439-441.
- Shewell, G.E. 1987. Family Calliphoridae. In: Mc Alpine, J.F., Peterson, B.V., Shewell, G.E., Teskey, H.J., Vockeroth, J.R. & Wood, D.M. (Eds). *Manual of Nearctic Diptera*. Vol. 2. Ottawa, Research Branch Agriculture Canada, pp. 675-1332.
- Silveira, M. 1998. Preparo de amostras biológicas para Microscopia Eletrônica de Varredura. In: Haddad, A., Júnior, I., Silva, E.V. & Dias, M. *Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas*. Rio de Janeiro, Soc. Bras. Microscopia. pp.33-37.
- Silveira Neto, S., Nakano, O., Barbin, D. & Villa Nova, N.A. 1976. *Manual de Ecologia dos Insetos*. São Paulo, Ed. Ceres. 419p.
- Simon, C.F., McIntosh, C. & Deniega, J. 1993. Standard restriction fragment length analysis of the mitochondrial genome is not sensitive enough for phylogenetic analysis or identification of 17-year periodical cicada broods (Hemiptera: Cicadidae): the potential for a new technique. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 86: 228-238.
- Simon, C.F., Fratti, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87: 657-701.
- Smith, K.G.V. 1986. A Manual of forensic entomology, British Museum Natural History, Cornell University Press, London. 205p.
- Souza, A.M. & Linhares, A.X. 1997. Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. *Med. Vet. Entomol.*, 11: 8-12.
- Souza, A.M. 1998. *Biologia em laboratório dos estágios imaturos de espécies de Calliphoridae e Sarcophagidae (Diptera), de importância medicolegal na região de Campinas, São Paulo*. Tese de Doutorado. 94p.
- Sperling, F.A.H., Anderson, G.S. & Hickey, D.A. 1994. A DNA-based approach to the identification of insect species used for post-mortem interval estimation. *J. For. Sci.*, 39: 418-427.
- Stevens, J. & Wall, R. 2001. Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. *For. Sci. Int.*, 120: 116-123.
- Tantawi, T.I. & Greenberg, B. 1993. The effect of killing and preservative solutions on estimates of maggot age in forensic cases. *J. For. Sci.*, 38: 702-707.
- Tavares, M.C.H. 2003. *Sucessão faunística de populações de insetos associados à decomposição de carcaças de suínos expostas em diferentes altitudes e condições pluviométricas na reserva florestal da Serra do Japi, Jundiá, SP*. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. Tese de Doutorado. 121p.
- Thyssen, P.J. 2000. Decomposição e sucessão entomológica em carcaças de suínos (*Sus scrofa* L.) de tamanhos diferentes: estudos em ambiente de mata natural na região de Campinas – SP. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. Dissertação de Mestrado. 85p.

- Ulyett, G. C. 1950. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations *Phil. Trans. Royal Soc. London*, 234: 77-174.
- Von Zuben, C.J.; Bassanezi, R.C.; Reis, S.F.; Godoy, W.A.C.; Zuben, F.J.V. 1996. Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. *J. Appl. Entomol.*, 120: 379-382.
- Von Zuben, C.J.; Stangenhans, G.; Godoy, W.A.C. 2000. Competição larval em *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae): efeitos de diferentes níveis de agregação larval sobre estimativas de peso, fecundidade e investimento reprodutivo. *Rev. Bras. Biol.*, 60: 195-
- Wall, R., French, N. & Morgan, K.L. 1992. Effects of temperature on the development and abundance of the sheep blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Bull. Ent. Res.*, 82: 125-131.
- Wallman, J.F. 2001. Third-instar larvae of common carrion-breeding blowflies of the genus *Calliphora* in South Australia. *Invert. Taxon.*, 15: 37-51.
- Wallman, J.F. & Donnellan, S.C. 2001. The utility of mitochondrial DNA sequences for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in southeastern Australia. *For. Sci. Intern.*, 120: 60-67.
- Wells, J.D.; Greenberg, B. 1992. Laboratory interaction between introduced *Chrysomya rufifacies* and native *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Env. Entomol.*, 21: 640-645.
- Wells, J.D. & LaMotte, L.R. 1995. Estimating maggot age from weight using inverse prediction. *J. For. Sci.*, 40: 585-590.
- Wells, J.D. & LaMotte, L.R. 2001. Estimating the post-mortem interval. In: Byrd, J.H. & Castner, J.L. (eds). *Forensic entomology*. CRC Press, Washington, DC. pp.263-285.
- Wells, J.D. & Sperling, F.A.H. 2001. DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). *For. Sci. Int.*, 120: 110-115.
- Wells, J.D., Pape, T. & Sperling, F.A.H. 2001. DNA-based identification and molecular systematics of forensically important Sarcophagidae Diptera. *J. For. Sci.*, 46: 1098-1102.
- Wigglesworth, V.B. 1972. The principles of Insect Physiology, Chapman and Hall, London. pp.663-669.
- Zhang, D.X. & Hewitt, G.M. 1997. Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochem. Syst. Ecol.*, 25: 99-120.
- Zehner, R., Amendt, J., Schutt, S., Sauer, J., Krettek, R. & Povolný, D. 2004. Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). *Int J. Legal Med.*, 118: 245-247.
- Zumpt, F. 1965. *Myiasis in man and animals in the old world*. Butherworths, London. 267p.

## 9 — ANEXOS

**Tabela 6:** Médias de peso (mg) obtidas para os estádios larvais de *Hemilucilia segmentaria* criados em diferentes temperaturas.

Idade (h)	Temperaturas (°C)					
	10	15	20	25	30	35
6	0.0001	0.0001	0.0001	0.0003	0.0010	0.0010
12			0.0004	0.0007	0.0029	0.0031
18	0.0002	0.0004	0.0008	0.0013	0.0054	0.0061
24			0.0012	0.0045	0.0111	0.0143
30	0.0003	0.0008	0.0027	0.0094	0.0261	0.0376
36			0.0045	0.0148	0.0412	0.0508
42	0.0006	0.0012	0.0068	0.0239	0.0535	0.0596
48			0.0114	0.0371	0.0570	0.0716
54	0.0013	0.0027	0.0217	0.0476	0.0598	0.0756
60			0.0305	0.0497	0.0629	0.0807
66	0.0015	0.0050	0.0413	0.0532	0.0673	0.0837
72			0.0539	0.0624	0.0722	0.0854
78	0.0018	0.0071	0.0601	0.0628	0.0731	0.0854
84			0.0624	0.0645	0.0759	0.0863
90	0.0021	0.0094	0.0633	0.0654	0.0716	0.0874
96			0.0642	0.0674	0.0694	0.0875
102	0.0027	0.0117	0.0655	0.0682	0.0693	0.0880
108			0.0700	0.0695	0.0691	0.0906
114	0.0032	0.0145	0.0724	0.0731	0.0688	0.0914
120			0.0728	0.0656	0.0682	0.0914
126	0.0045	0.0156	0.0743	0.0645	0.0676	0.0878
132			0.0745	0.0595	0.0645	0.0818
138	0.0053	0.0178	0.0714	0.0569	0.0640	0.0781
144			0.0706	0.0499	0.0584	0.0742
150	0.0054	0.0192	0.0689	0.0456	0.0490	
156			0.0689	0.0451		
162	0.0063	0.0237	0.0516			
168			0.0504			
174	0.0066	0.0275	0.0497			
186	0.0067	0.0325				
198	0.0067	0.0374				
210	0.0073	0.0445				
222	0.0076	0.0525				
234	0.0076	0.0508				
246	0.0087	0.0468				
258	0.0082	0.0414				
270	0.0083	0.0389				
282	0.0092	0.0395				
294	0.0085					
306	0.0093					
318	0.0104					

**Tabela 7:** Médias de comprimento (cm) obtidas para os estádios larvais de *Hemilucilia segmentaria* criados em diferentes temperaturas.

Idade (h)	Temperaturas (°C)					
	10	15	20	25	30	35
6	0.0982	0.1449	0.2002	0.2166	0.2665	0.2675
12			0.2249	0.2583	0.4865	0.3208
18	0.1018	0.1890	0.2890	0.3588	0.8099	0.5557
24			0.3608	0.4354	1.0318	0.8039
30	0.1102	0.2290	0.4599	0.8298	1.0807	1.1885
36			0.5907	0.9379	1.2869	1.2322
42	0.1108	0.3008	0.8932	1.0577	1.3295	1.3827
48			0.9519	1.2745	1.3761	1.5174
54	0.1249	0.3599	1.1087	1.3702	1.4499	1.4800
60			1.0427	1.3606	1.4050	1.4687
66	0.1449	0.5307	1.1914	1.5116	1.4632	1.5617
72			1.3919	1.5282	1.5144	1.5934
78	0.1495	0.6507	1.4495	1.4781	1.5475	1.5383
84			1.4105	1.4489	1.5388	1.6010
90	0.1890	0.7807	1.4708	1.4850	1.5406	1.6364
96			1.3816	1.4523	1.5276	1.6324
102	0.2290	0.8932	1.3850	1.4462	1.4551	1.6244
108			1.4367	1.4999	1.5256	1.6142
114	0.2590	0.9519	1.5133	1.5275	1.5879	1.7150
120			1.5408	1.5240	1.5416	1.6593
126	0.2608	1.1068	1.4908	1.5142	1.5219	1.6558
132			1.4828	1.4791	1.5224	1.6016
138	0.3008	1.1087	1.4491	1.4078	1.4833	1.5758
144			1.4937	1.3567	1.4531	1.5759
150	0.3018	1.1097	1.3685	1.2537	1.3983	
156			1.3547	0.8058		
162	0.3589	1.1301	1.2920			
168			1.2101			
174	0.3599	1.1360	1.2490			
186	0.3600	1.1360				
198	0.3660	1.1451				
210	0.3639	1.1553				
222	0.4507	1.1553				
234	0.4707	1.1868				
246	0.5532	1.1787				
258	0.5832	1.1427				
270	0.5889	1.0836				
282	0.5898	1.0014				
294	0.5532					
306	0.5677					
318	0.5643					

**Tabela 8:** Médias de peso (mg) obtidas para os estádios larvais de *Hemilucilia semidiaphana* criados em diferentes temperaturas.

Idade (h)	Temperaturas (°C)				
	15	20	25	30	35
6	0.0001	0.0001	0.0002	0.0009	0.0009
12		0.0003	0.0006	0.0028	0.0030
18	0.0006	0.0006	0.0011	0.0052	0.0059
24		0.0009	0.0042	0.0108	0.0140
30	0.0010	0.0024	0.0091	0.0258	0.0373
36		0.0042	0.0145	0.0409	0.0505
42	0.0026	0.0064	0.0235	0.0531	0.0592
48		0.0109	0.0366	0.0565	0.0711
54	0.0045	0.0212	0.0471	0.0593	0.0751
60		0.0301	0.0492	0.0624	0.0802
66	0.0055	0.0408	0.0527	0.0668	0.0832
72		0.0534	0.0619	0.0717	0.0849
78	0.0086	0.0593	0.0620	0.0723	0.0846
84		0.0616	0.0637	0.0751	0.0855
90	0.0092	0.0625	0.0646	0.0708	0.0866
96		0.0634	0.0666	0.0686	0.0867
102	0.0102	0.0640	0.0667	0.0678	0.0865
108		0.0685	0.0680	0.0676	0.0891
114	0.0115	0.0709	0.0693	0.0673	0.0899
120		0.0713	0.0699	0.0667	0.0863
126	0.0135	0.0728	0.0716	0.0661	0.0798
132		0.0725	0.0641	0.0625	0.0761
138	0.0141	0.0694	0.0630	0.0620	0.0726
144		0.0686	0.0575	0.0647	0.0662
150	0.0165	0.0674	0.0549	0.0613	
156		0.0678	0.0544	0.0589	
162	0.0177	0.0505	0.0534	0.0553	
168		0.0511	0.0479	0.0475	
174	0.0226	0.0538	0.0441		
180		0.0516	0.0445		
186	0.0270	0.0501			
192		0.0475			
198	0.0295	0.0463			
210	0.0320	0.0409			
222	0.0345				
234	0.0369				
246	0.0399				
258	0.0480				
270	0.0441				
282	0.0438				
294	0.0437				
306	0.0432				

**Tabela 9:** Médias de comprimento (cm) obtidas para os estádios larvais de *Hemilucilia semidiaphana* criados em diferentes temperaturas.

Idade (h)	Temperaturas (°C)				
	15	20	25	30	35
6	0.0998	0.1238	0.1290	0.1954	0.2453
12		0.1588	0.1838	0.2372	0.4653
18	0.1156	0.1964	0.2388	0.3287	0.7798
24		0.1888	0.3383	0.4028	0.9993
30	0.1465	0.2180	0.4098	0.7896	1.0405
36		0.2551	0.5379	0.8951	1.2441
42	0.2687	0.3132	0.8275	1.0120	1.2838
48		0.3123	0.8952	1.2278	1.3294
54	0.3236	0.4025	1.0311	1.3226	1.4024
60		0.4818	1.0994	1.3124	1.3568
66	0.3925	0.5017	1.1425	1.4627	1.4144
72		0.6007	1.3129	1.4792	1.4654
78	0.4689	0.6297	1.3790	1.4281	1.4875
84		0.7177	1.3895	1.3979	1.4878
90	0.5869	0.7496	1.4078	1.4220	1.4776
96		0.8195	1.4105	1.3812	1.4565
102	0.8113	0.8570	1.4113	1.3726	1.3814
108		0.8756	1.4618	1.4250	1.4508
114	0.9417	1.0254	1.4706	1.4513	1.4916
120		1.0206	1.4625	1.4457	1.4633
126	0.9299	1.0324	1.4045	1.4280	1.4357
132		1.0986	1.3766	1.3729	1.2727
138	1.0160	1.1859	1.2588	1.2850	1.1727
144		1.1848	1.1923	1.1671	1.0832
150	1.0251	1.0986	1.1248	1.1211	
156		1.0657	1.0985	1.1084	
162	1.0253	1.0367	1.0539	1.0818	
168		1.0195	1.0461	1.0692	
174	1.0453	1.0119	1.0342		
180		1.0003	1.0397		
186	1.1033	0.9975			
198		0.9801			
204	1.0568	0.9458			
210		0.9122			
222	1.0506				
234	1.0487				
246	1.0383				
258	1.0127				
270	0.9536				
282	0.8714				
294	0.8334				
306	0.8219				

**Tabela 10:** Ajuste de curvas com relação a variável peso para os estádios larvais de *Hemilucilia segmentaria* criada a 15°C.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	24	24	24	24
Intercepto (a)	-0.0062	0.0009	-0.0493	0.0000
Coef. regressão (b)	0.0002	0.0177	0.0154	1.7608
Coef. determinação ( $R^2$ )	0.8981	0.7862	0.6760	0.9801
Graus de liberdade	22	22	22	22
p	p <.00001	p <.00001	p <.00001	0.0040

**Tabela 11:** Ajuste de curvas com relação a variável peso para os estádios larvais de *Hemilucilia segmentaria* criada a 20°C.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	30	30	30	30
Intercepto (a)	0.0056	0.0019	-0.0758	0.0000
Coef. regressão (b)	0.0004	0.0265	0.0281	2.0201
Coef. determinação ( $R^2$ )	0.6256	0.6014	0.7264	0.8995
Graus de liberdade	28	28	28	28
p	p <.00001	p <.00001	p <.00001	p <.00001

**Tabela 12:** Ajuste de curvas com relação a variável peso para os estádios larvais de *Hemilucilia segmentaria* criada a 25°C.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	27	27	27	27
Intercepto (a)	0.0143	0.0041	-0.0570	0.0000
Coef. regressão (b)	0.0004	0.0224	0.0243	1.6416
Coef. determinação ( $R^2$ )	0.5054	0.5014	0.7106	0.8378
Graus de liberdade	25	25	25	25
p	p <.00001	p <.00001	p <.00001	p <.00001

**Tabela 13:** Ajuste de curvas com relação a variável peso para os estádios larvais de *Hemilucilia segmentaria* criada a 30°C.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	25	25	25	25
Intercepto (a)	0.0232	0.0101	-0.0504	0.0003
Coef. regressão (b)	0.0004	0.0173	0.0252	1.2215
Graus de liberdade	23	23	23	23
p	0.0001	0.0002	p <.00001	p <.00001

**Tabela 14:** Ajuste de curvas com relação a variável peso para os estádios larvais de *Hemilucilia segmentaria* criada a 35°C.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	24	24	24	24
Intercepto (a)	0.0237	0.0105	-0.0721	0.0002
Coef. regressão (b)	0.0006	0.0200	0.0340	1.3287
Coef. determinação ( $R^2$ )	0.6282	0.4916	0.8524	0.8318
Graus de liberdade	22	22	22	22
p	p < .00001	0.0001	p < .00001	p < .00001

**Tabela 15:** Ajuste de curvas com relação a variável comprimento para os estádios larvais de *Hemilucilia segmentaria* criada a 15°C.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	24	24	24	24
Intercepto (a)	0.3305	0.2980	-0.7965	0.0345
Coef. regressão (b)	0.0037	0.0064	0.3556	0.6563
Coef. determinação ( $R^2$ )	0.7380	0.6717	0.8516	0.9082
Graus de liberdade	22	22	22	22
p	p < .00001	p < .00001	p < .00001	p < .00001

**Tabela 16:** Ajuste de curvas com relação a variável comprimento para os estádios larvais de *Hemilucilia segmentaria* criada a 20°C.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	30	30	30	30
Intercepto (a)	0.5598	0.4556	-0.8184	0.0607
Coef. regressão (b)	0.0061	0.0084	0.4553	0.6533
Coef. determinação ( $R^2$ )	0.5724	0.5462	0.8102	0.8508
Graus de liberdade	28	28	28	28
p	p < .00001	p < .00001	p < .00001	p < .00001

**Tabela 17:** Ajuste de curvas com relação a variável comprimento para os estádios larvais de *Hemilucilia segmentaria* criada a 25°C.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	27	27	27	27
Intercepto (a)	0.7566	0.5812	-0.4734	0.1009
Coef. regressão (b)	0.0049	0.0070	0.3932	0.5587
Coef. determinação ( $R^2$ )	0.2981	0.3402	0.5902	0.6812
Graus de liberdade	25	25	25	25
p	0.0032	0.0014	p < .00001	p < .00001



**Tabela 18:** Ajuste de curvas com relação a variável comprimento para os estádios larvais de *Hemilucilia segmentaria* criada a 30°C.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	25	25	25	25
Intercepto (a)	0.8903	0.7777	-0.2293	0.2056
Coef. regressão (b)	0.0056	0.0061	0.3782	0.4390
Coef. determinação ( $R^2$ )	0.5216	0.4208	0.8545	0.7822
Graus de liberdade	23	23	23	23
p	p <.00001	0.0004	p <.00001	p <.00001

**Tabela 19:** Ajuste de curvas com relação a variável comprimento para os estádios larvais de *Hemilucilia segmentaria* criada a 35°C.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	24	24	24	24
Intercepto (a)	0.7710	0.6522	-0.6190	0.1240
Coef. regressão (b)	0.0079	0.0087	0.4874	0.5668
Coef. determinação ( $R^2$ )	0.6146	0.5087	0.8864	0.8350
Graus de liberdade	22	22	22	22
p	p <.00001	0.0001	p <.00001	p <.00001

**Tabela 20:** Ajuste de curvas com relação a variável peso para os estádios larvais de *Hemilucilia semidiaphana* criada a 15°C.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	26	26	26	26
Intercepto (a)	-0.0054	0.0012	-0.0459	0.0000
Coef. Regressão (b)	0.0002	0.0145	0.0142	1.5807
Coef. determinação ( $R^2$ )	0.9636	0.7664	0.7045	0.9916
Graus de liberdade	24	24	24	24
p	0.0001	p <.00001	p <.00001	0.1346

**Tabela 21:** Ajuste de curvas com relação a variável peso para os estádios larvais de *Hemilucilia semidiaphana* criada a 20°C.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	35	35	35	35
Intercepto (a)	0.0148	0.0026	-0.0598	0.0000
Coef. regressão (b)	0.0003	0.0202	0.0235	1.8643
Coef. determinação ( $R^2$ )	0.4278	0.5017	0.6284	0.8419
Graus de liberdade	33	33	33	33
p	p <.00001	p <.00001	p <.00001	p <.00001

**Tabela 22:** Ajuste de curvas com relação a variável peso para os estádios larvais de *Hemilucilia semidiaphana* criada a 25°C.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	30	30	30	30
Intercepto (a)	0.0181	0.0049	-0.0531	0.0000
Coef. regressão (b)	0.0003	0.0190	0.0232	1.5678
Coef. determinação ( $R^2$ )	0.4594	0.4593	0.6993	0.8115
Graus de liberdade	28	28	28	28
p	p <.00001	p <.00001	p <.00001	p <.00001

**Tabela 23:** Ajuste de curvas com relação a variável peso para os estádios larvais de *Hemilucilia semidiaphana* criada a 30°C.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	28	28	28	28
Intercepto (a)	0.0281	0.0121	-0.0412	0.0004
Coef. regressão (b)	0.0003	0.0138	0.0224	1.1195
Coef. determinação ( $R^2$ )	0.3995	0.3931	0.7043	0.7613
Graus de liberdade	26	26	26	26
p	0.0003	0.0004	p <.00001	p <.00001

**Tabela 24:** Ajuste de curvas com relação a variável peso para os estádios larvais de *Hemilucilia semidiaphana* criada a 35°C.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	24	24	24	24
Intercepto (a)	0.0254	0.0106	-0.0665	0.0002
Coef. regressão (b)	0.0005	0.0195	0.0322	1.3123
Coef. determinação ( $R^2$ )	0.5601	0.4713	0.8070	0.8164
Graus de liberdade	22	22	22	22
p	p <.00001	0.0002	p <.00001	p <.00001

**Tabela 25:** Ajuste de curvas com relação a variável comprimento para os estádios larvais de *Hemilucilia semidiaphana* criada a 15°C.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	26	26	26	26
Intercepto (a)	0.3236	0.2478	-0.7292	0.0213
Coef. regressão (b)	0.0029	0.0061	0.3161	0.7169
Coef. determinação ( $R^2$ )	0.5904	0.5835	0.7686	0.8679
Graus de liberdade	24	24	24	24
p	p <.00001	p <.00001	p <.00001	p <.00001

**Tabela 26:** Ajuste de curvas com relação a variável comprimento para os estádios larvais de *Hemilucilia semidiaphana* criada a 20°C.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	35	35	35	35
Intercepto (a)	0.2058	0.2273	-0.8707	0.0235
Coef. regressão (b)	0.0050	0.0094	0.3647	0.7424
Coef. determinação ( $R^2$ )	0.7817	0.7503	0.8285	0.9206
Graus de liberdade	33	33	33	33
p	p <.00001	p <.00001	p <.00001	p <.00001

**Tabela 27:** Ajuste de curvas com relação a variável comprimento para os estádios larvais de *Hemilucilia semidiaphana* criada a 25°C.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	30	30	30	30
Intercepto (a)	0.5714	0.4113	-0.6944	0.0466
Coef. regressão (b)	0.0050	0.0084	0.4050	0.6908
Coef. determinação ( $R^2$ )	0.4075	0.4513	0.6853	0.7946
Graus de liberdade	28	28	28	28
p	0.0001	p <.00001	p <.00001	p <.00001

**Tabela 28:** Ajuste de curvas com relação a variável comprimento para os estádios larvais de *Hemilucilia semidiaphana* criada a 30°C.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	28	28	28	28
Intercepto (a)	0.7277	0.5476	-0.4561	0.0902
Coef. regressão (b)	0.0046	0.0071	0.3760	0.5732
Coef. determinação ( $R^2$ )	0.3358	0.3772	0.6519	0.7295
Graus de liberdade	26	26	26	26
p	0.0012	0.0005	p <.00001	p <.00001

**Tabela 29:** Ajuste de curvas com relação a variável comprimento para os estádios larvais de *Hemilucilia semidiaphana* criada a 35°C.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	24	24	24	24
Intercepto (a)	0.8891	0.7568	-0.1220	0.2049
Coef. regressão (b)	0.0046	0.0057	0.3335	0.4261
Coef. determinação ( $R^2$ )	0.3559	0.3299	0.7053	0.6992
Graus de liberdade	22	22	22	22
p	0.0021	0.0033	p <.00001	p <.00001

**Tabela 30:** Ajuste de curvas para a relação tempo de desenvolvimento total vs temperatura para a espécie *Hemilucilia segmentaria*.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	5	5	5	5
Intercepto (a)	545.6000	606.2887	995.4460	2189.7591
Coef. regressão (b)	8.5200	0.0247	208.7151	0.5990
Coef. determinação ( $R^2$ )	0.8569	0.9035	0.9213	0.9503
Graus de liberdade	3	3	3	3
p	0.0240	0.0131	0.0096	0.0048

**Tabela 31:** Ajuste de curvas para a relação tempo de desenvolvimento total vs temperatura para a espécie *Hemilucilia semidiaphana*.

Parâmetros	Linear	Exponencial	Logarítmica	Geométrica
n	5	5	5	5
Intercepto (a)	684.9000	752.3563	1181.0441	2252.7959
Coef. regressão (b)	9.7000	0.0217	232.5822	0.5163
Coef. determinação ( $R^2$ )	0.9641	0.9847	0.9932	0.9966
Graus de liberdade	3	3	3	3
p	0.0029	0.0008	0.0009	0.0113